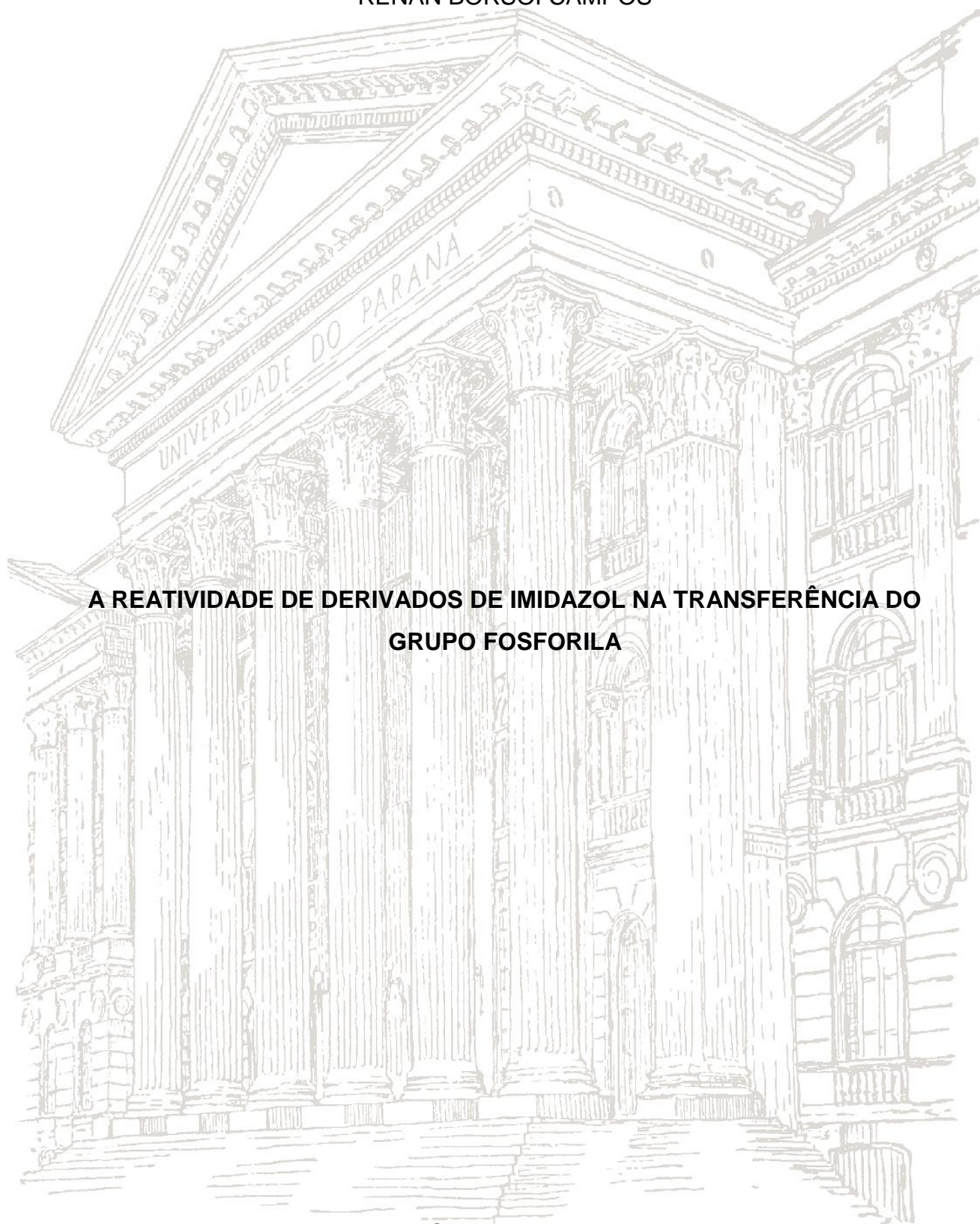


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

RENAN BORSOI CAMPOS



**A REATIVIDADE DE DERIVADOS DE IMIDAZOL NA TRANSFERÊNCIA DO
GRUPO FOSFORILA**

CURITIBA-PR

2017

RENAN BORSOI CAMPOS

**A REATIVIDADE DE DERIVADOS DE IMIDAZOL NA TRANSFERÊNCIA DO
GRUPO FOSFORILA**

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Físico-Química, no Curso de Pós-Graduação em Química, Setor de Ciências Exatas, da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Elisa Souza Orth

CURITIBA-PR

2017

C198r

Campos, Renan Borsoi

A reatividade de derivados de imidazol na transferência do grupo fosforila / Renan Borsoi Campos. – Curitiba, 2017.

217 f. : il. color. ; 30 cm.

Tese - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2017.

Orientadora: Elisa Souza Orth.

Bibliografia: p. 147-161.

1. Derivados de imidazol. 2. Reatividade de nucleófilos.
3. Desfosforilação. I. Universidade Federal do Paraná. II. Orth, Elisa Souza. III. Título.

CDD: 526

TERMO DE APROVAÇÃO

**A REATIVIDADE DE DERIVADOS DE IMIDAZOL NA
TRANSFERÊNCIA DO GRUPO FOSFORILA**

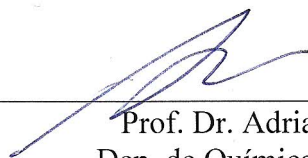
por

RENAN BORSOI CAMPOS

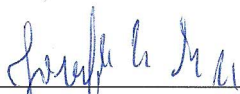
Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Química, pela Comissão Examinadora composta por:



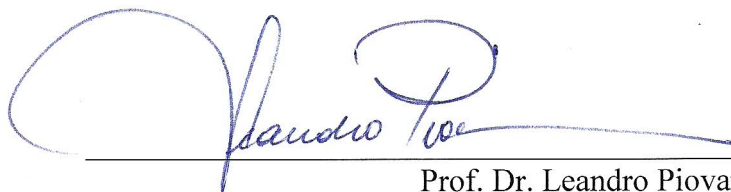
Prof.^a Dr.^a Elisa Souza Orth
Orientador
Dep. de Química – UFPR



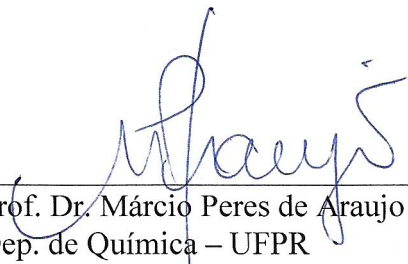
Prof. Dr. Adriano Lisboa Monteiro
Dep. de Química Orgânica - UFRGS



Prof. Dr. Josefredo Rodriguez Pliego Junior
Dep. de Ciências Naturais - UFSJ



Prof. Dr. Leandro Piovan
Dep. de Química – UFPR



Prof. Dr. Márcio Peres de Araujo
Dep. de Química – UFPR

Curitiba, 10 de abril de 2017.

À minha esposa, Alessandra, ao
meu irmão, Gabriel, à minha mãe,
Marlene e ao meu pai, Reinan.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Professora Elisa Orth pela orientação, comprometimento e dedicação ao longo desses quatro anos. Também sou grato por ter sido a principal responsável pela minha formação acadêmica, por ter me oportunizado trabalhar com um projeto tão interessante, pelas enriquecedoras e motivadoras conversas e, sobretudo, por ter acreditado em mim. Aos membros do Grupo de Catálise e Cinética, do Grupo de Pesquisa em Macromoléculas e Interfaces e do Grupo de Química de Materiais agradeço pelo companheirismo e pela formidável rotina diária, proporcionando excelentes momentos, dividindo as alegrias e ansiedades da vida na pós-graduação. Agradeço ao Valmir pela enorme parceria e também pelas importantes contribuições na parte experimental.

Ao Professor Dean Tantillo, agradeço pela excelente convivência e proximidade que proporcionou durante o período sanduíche, pela efetiva orientação na parte de cálculos e fundamental participação nesse trabalho. Também agradeço pelos projetos paralelos e pelo acesso irrestrito à sua infraestrutura. Aos membros do seu grupo sou grato pela ajuda e acolhimento, que facilitaram a adaptação e aprendizagem.

Agradeço ao Professor Aldo Zarbin, por ter concedido o uso da infraestrutura do seu laboratório, ao Professor Alfredo de Oliveira pelas importantes análises por espectrometria de massas e ao Professor Bruno Souza pelas significativas contribuições. Também sou grato ao Professor Andersson Barison, à Fernanda Ocampos e ao Leociley Menezes pela intensa colaboração com as análises por ressonância magnética nuclear, sendo de valor essencial na compreensão das reações aqui abordadas, desde o início do desenvolvimento do projeto.

Aos membros da banca, Prof. Adriano Lisboa Monteiro, Prof. Josefredo Rodriguez Pliego Júnior, Prof. Márcio Peres de Araujo e Prof. Leandro Piovan, agradeço por terem aceitado o convite de participar da avaliação desse trabalho e também pelas discussões e contribuições. Agradeço ainda ao professor Harley Paiva Martins Filho pela convivência e pelas importantes considerações na banca do exame de qualificação.

Agradeço à CAPES pela bolsa durante o período no exterior e à UFPR pelo amparo durante toda a graduação e pós-graduação. Reservo um agradecimento especial à UTFPR, por ter me concedido a oportunidade da realização do doutorado.

Ao meu pai, Reinan e à minha mãe, Marlene, sou inteiramente grato por tudo que me transmitiram e inspiraram, com amor e dedicação incondicionais, e por terem me dado a oportunidade de estudar. Agradeço também ao meu irmão Gabriel, pela inestimável cumplicidade, respeito e carinho. Minha felicidade só é repleta porque fazem parte da minha vida.

Agradeço imensamente à minha querida esposa, Alessandra, por estar presente, sendo afetuosa, meiga, compreensiva, e companheira. Agradeço pelas inúmeras demonstrações de carinho, e por sempre acreditar que eu seria capaz.

Finalmente, agradeço a todos os amigos e familiares, pelo apoio e compreensão. Certamente foram importantes em muitas etapas durante toda essa caminhada.

*“Hydrogen is a light, odorless gas, which,
given enough time, turns into people.”*

Edward Robert Harrison

RESUMO

A transferência do grupo fosforila está envolvida em muitos processos importantes que vão desde a detoxificação de pesticidas até funções biológicas vitais. Essa reação é eficientemente promovida por imidazol (IMZ) e ainda não há uma compreensão concisa da reatividade de seus derivados, o que poderia nortear desenvolvimento de novas moléculas com propriedades otimizadas. Nesse trabalho, a reatividade de derivados de IMZ frente ao triéster dietil-2,4-dinitrofenilfosfato (DEDNPP) foi investigada por meio de estudos cinéticos por UV-Vis, espectrometria de massas, ressonância magnética nuclear (RMN) e cálculos teóricos, tendo como foco avaliar o efeito de substituintes, do tautomerismo e do meio reacional. Dentre os medicamentos derivados de IMZ estudados, o metimazol (MMZ) foi o que apresentou a maior atividade catalítica, com incrementos na ordem de 10^6 vezes comparado à hidrólise espontânea do triéster. Foi observado que o fármaco apresenta caráter ambinucleofílico e mecanismo de desfosforilação modulado pelo pH do meio, com MMZ neutro atuando preferencialmente via ataque concertado do nitrogênio ao fósforo. Já sua espécie aniônica leva ao produto de substituição nucleofílica aromática pelo ataque do enxofre ao carbono. Nos estudos referentes ao efeito do substituinte, os derivados metilados monossobstituídos também se mostraram eficientes catalisadores na clivagem do DEDNPP. O 4(5)metilimidazol (4(5)MEI) apresentou a maior atividade catalítica, seguido pelo IMZ, 1-metilimidazol (1MEI) e 2-metilimidazol (2MEI), sendo essa ordem independente da basicidade. O 4(5)MEI é único derivado metilado com tautômeros distintos (4MEI e 5MEI) e foi possível diferenciar suas reatividades por meio de técnicas de RMN, indicando que o 5MEI apresenta maior nucleofilicidade. Ainda, cálculos teóricos revelaram que a atividade catalítica do 2MEI e 4MEI é minimizada por efeitos estéricos, enquanto a maior reatividade do 5MEI é resultante da alta energia do par de elétrons nucleofílico. A influência do meio (misturas DMSO/água) foi avaliada para as reações envolvendo o IMZ e 1MEI, sendo mostrado que ambientes ricos em DMSO potencializam a reatividade de ambos. Por outro lado, composições ricas em água levam a maior solvatação dos nucleófilos, diminuindo sua reatividade, sendo mais evidente no IMZ devido a sua maior capacidade de formação de ligações de hidrogênio com o meio. No estudo da influência do substituinte OH na reatividade do 4(5)hidroximetilimidazol (4(5)HMZ), evidências sugeriram que o intermediário fosforilado detectado, seja formado pelo ataque do nitrogênio ao fósforo do DEDNPP, em detrimento ao ataque pelo oxigênio via catálise básica geral. Cálculos revelaram que o 5HMZ, que não é impedido estericamente, tem barreira de ativação ligeiramente inferior que o 4HMZ. Porém, observou-se que o efeito estérico causado pelo substituinte no ataque nucleofílico do 4HMZ é energeticamente compensado por uma ligação de hidrogênio entre o grupo OH e a fosforila do triéster. Essa interação estabiliza o estado de transição, levando o 4HMZ a apresentar reatividade similar ao 5HMZ. Esses resultados motivaram a realização de cálculos visando arquitetar um novo catalisador imidazólico para desfosforilação. Dentre os nove derivados avaliados, a maior reatividade foi apresentada pelo 2-hidroximidazol, no qual o grupo OH ocupa posição adjacente ao par de elétrons nucleofílico, reafirmando a importância da formação da ligação de hidrogênio no desenvolvimento de um catalisador eficiente. Assim, metodologias teórico-experimentais permitiram elucidar a reatividade de diversos derivados de IMZ, levando a uma melhor compreensão da influência de substituintes em processos de transferência do grupo fosforila.

Palavras-chave: derivados de imidazol, reatividade de nucleófilos, desfosforilação.

ABSTRACT

Phosphoryl group transfer is involved in many important processes ranging from the detoxification of pesticides to vital biological functions. This reaction is efficiently promoted by imidazole (IMZ) and there is not yet a concise understanding of the reactivity of IMZ derivatives, which could guide the development of new molecules with optimized properties. In this work, the reactivity of IMZ derivatives with the triester diethyl-2,4-dinitrophenylphosphate (DEDNPP) was investigated by means of kinetic studies by UV-Vis, mass spectrometry, nuclear magnetic resonance (NMR) and theoretical calculations. The main focus was to assess the influence of substituents, tautomerism and reaction medium. Among the IMZ-derived drugs studied, methimazole (MMZ) presented the highest catalytic activity with rate enhancements in the order of 10^6 -fold compared to the spontaneous hydrolysis of the triester. It was observed that the drug has an ambident nucleophilic character and the dephosphorylation mechanisms are modulated by the pH. Neutral MMZ reacts preferentially via concerted nucleophilic attack by nitrogen on phosphorus, while the most favorable pathway for the anionic form is the nucleophilic aromatic substitution by sulfur on carbon. Studies concerning on the effect of the substituent showed that the monosubstituted methylated derivatives are also efficient catalysts for the cleavage of DEDNPP. The 4(5)MEI is the only methylated derivative with distinct tautomers (4MEI and 5MEI) and it was possible to distinguish their reactivities by means of NMR techniques. Results indicated that 5MEI has the highest nucleophilicity compared to 4MEI. Furthermore, theoretical calculations have shown that the catalytic activity of 2MEI and 4MEI is minimized by steric effects, while the higher reactivity of 5MEI is correlated to the high energy of the nucleophilic electron pair. The influence of the medium was also evaluated in the reactions involving IMZ and 1MEI. It was quantitatively shown that DMSO-rich environments increase the reactivity of both nucleophiles. On the other hand, water-rich compositions lead to a higher solvation of nucleophiles, reducing their catalytic activity. This effect is more evident for IMZ due to its greater capability to form hydrogen bonds with the medium. The influence of the OH substituent was evaluated assessing the reactivity of 4(5)hydroxymethylimidazole (4(5)HMZ) towards DEDNPP. Evidences indicate that the detected phosphorylated intermediate is formed from the nucleophilic attack by the nitrogen lone pair to the phosphorus, in contrast to a general basic catalysis pathway by the hydroxyl group. Calculations revealed that the 5HMZ, which is not sterically hindered, presents a slightly lower activation barrier. However, it was observed that the steric effect caused by the substituent during the nucleophilic attack of the 4HMZ tautomer is energetically compensated by the formation of a hydrogen bond between the hydroxyl group and the triester phosphoryl oxygen. This interaction stabilizes the transition state, leading the 4HMZ to present similar reactivity compared to 5HMZ. These results instigated us to pursuit theoretical calculations aiming at modeling new imidazole catalysts for dephosphorylation. Among the nine IMZ derivatives evaluated, 2-hydroxymidazole presented the highest reactivity, due to the OH group adjacent to the nucleophilic electron pair. These results reaffirm the importance of the hydrogen bond formation in the development of an efficient catalyst. Therefore, the combination of theoretical and experimental methodologies allowed elucidating the reactivity of several derivatives of IMZ, providing a better understanding of the influence of substituents on phosphoryl group transfer processes.

Keywords: imidazole derivatives, reactivity of nucleophiles, dephosphorylation

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Nitrogênios no IMZ e orbitais moleculares σ (não ligante) e π (aromáticos).	22
Figura 2. Diagrama de More O'Ferrall-Jencks contendo os mecanismos de reações de substituição em ésteres de fosfato via átomo de fósforo.....	40
Figura 3. Estrutura geral dos nucleófilos avaliados em reação com o triéster 2,4-dinitrofenil fosfato e plots de Bronsted referentes a fenóis(\blacktriangle), piridinas (o), e aminas secundárias (\bullet). ⁸³	46
Figura 4. Diagrama de energia para os mecanismos de clivagem do diéster BMIPP propostos de acordo com Esquema 24, sendo ET-BG e ET-NUC os ET obtidos para as catálises básica-geral e nucleofílica, respectivamente.	56
Figura 5. Reação da histidina em polialanina com um éster. O ET calculado mostra importantes interações construtivas na estrutura molecular. ¹⁰³	57
Figura 6. A. Espectros típicos pré e pós reação de clivagem do DEDNPP. B. Perfil de pseudo-primeira ordem obtido pelos dados referentes ao monitoramento da banda em 400 nm.	62
Figura 7. A. Espectros pré e pós reação do MMZ a $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ com DEDNPP em pH 10,5; B. Perfil obtido da reação do MMZ a $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ com DEDNPP (k_1) e formação do dímero MMZ_2 em 340 nm (k_2) a $25 \text{ }^\circ\text{C}$; C. Espectros sucessivos adquiridos da solução de MMZ a $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ com formação de MMZ_2 a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. D. Ajuste dos dados obtidos a partir dos espectros sucessivos da solução de MMZ (k_D).....	74
Figura 8. Perfil cinético em função do pH referente à reação do DEDNPP com MMZ ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$) e hidrólise espontânea do DEDNPP, ⁷ ambos obtidos a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. As linhas sólidas correspondem aos ajustes pela Equação 4.	76
Figura 9. Espectro de massas no modo positivo adquirido da reação do MMZ ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$) e DEDNPP em pH 10,5 a $25 \text{ }^\circ\text{C}$	79
Figura 10. ESI-MS/MS(+) do cátion de m/z 281 Da (MMZDNP)	79
Figura 11. ESI-MS/MS(+) do cátion de m/z 251 (MMZnPI ou MMZsPI) adquiridos da reação do MMZ ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$) e DEDNPP em pH 10,5 a $25 \text{ }^\circ\text{C}$	80
Figura 12. ESI-MS/MS(+) do cátion com m/z 227 Da (MMZ_2) adquirido da reação do de dimerização do MMZ a $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 10,5 a $25 \text{ }^\circ\text{C}$	81
Figura 13. Estruturas dos ET e intermediário CM da reação do MMZ neutro com DEDNPP obtidos com método B3LYP/6-31+g(d,p), referentes aos ataques do	

nitrogênio ao fósforo (N \cdots P), enxofre ao fósforo (S \cdots P), e enxofre ao carbono aromático (S \cdots C, C \cdots O). Átomo-cor: fósforo-laranja, enxofre-amarelo, oxigênio-vermelho, nitrogênio-azul, carbono-cinza, hidrogênio-branco.....	83
Figura 14. Barreiras reacionais da reação do DEDNPP com (A) MMZ neutro e (B) MMZ aniônico (B3LYP/6-31+g(d,p)) via ataque do nitrogênio ao fósforo (N-P), enxofre ao fósforo (S-P) e enxofre ao carbono aromático (S-C(Ar) com ET ₁ e ET ₂).	84
Figura 15. Rotas preferenciais da reação com DEDNPP com MMZ neutro e aniônico. O mecanismo é modulado pelo pH do meio.	86
Figura 16. Perfis de pH obtidos das reações dos xMEI (0,5 mol L ⁻¹) com DEDNPP, a 25 °C. A hidrólise espontânea do triéster (eixo da direita) e o perfil do IMZ estão mostrados para comparação. ⁷ As linhas sólidas representam os ajustes com a Eq. 4.	88
Figura 17. Espectros sucessivos de RMN de ³¹ P{ ¹ H} obtidos da reação do 1MEI (0,04 mol L ⁻¹) com DEDNPP (7,5 × 10 ⁻³ mol L ⁻¹) em pH 8,5 a 25 °C.....	92
Figura 18. Espectros sucessivos de RMN de ³¹ P{ ¹ H} obtidos da reação do 2MEI (0,3 mol L ⁻¹) com DEDNPP (7,5 × 10 ⁻³ mol L ⁻¹) em pH 8,5 a 25 °C.....	93
Figura 19. Espectros sucessivos de RMN de ³¹ P{ ¹ H} obtidos da reação do 4(5)MEI (0,3 mol L ⁻¹) com DEDNPP (7,5 × 10 ⁻³ mol L ⁻¹) em pH 8,5 a 25 °C.....	94
Figura 20. Perfis de concentração relativa em função do tempo referentes às espécies detectadas nas reações do (A) 1MEI, (B) 2MEI, (C) 4(5)MEI com DEDNPP por RMN de ³¹ P.....	96
Figura 21. Barreiras experimentais e calculadas (ΔG^\ddagger (kcal mol ⁻¹)) para as reações dos xMEI e IMZ com DEDNPP e estruturas dos ETs obtidas utilizando o método B3LYP/6-31G+(d,p).....	100
Figura 22. Diagrama de energia da coordenada da reação determinado com o método B3LYP/6-31+G(d,p).....	101
Figura 23. Gráficos da IRC referente às reações dos xMEI e IMZ com DEDNPP, calculados com método B3LYP/6-31+G(d,p).	103
Figura 24. Resumo dos resultados referentes ao posicionamento da metila e sua relação com a reatividade dos xMEI na reação com o DEDNPP.	106
Figura 25. A. Constantes de segunda ordem da reação (k_N) de IMZ (●) e 1MEI (○) com o DEDNPP e constantes de velocidade para hidrólise espontânea do DEDNPP (k_{obs}) (■) em cada fração molar da mistura DMSO/H ₂ O. B. As linhas azuis representam os valores dos parâmetros SA, SB e SPP. Em A. e B. as linhas	

vermelhas representam o ajuste dos dados experimentais por regressões múltiplas em função dos coeficientes SA, SB e SPP utilizando a Equação 17.	108
Figura 26. Possibilidades de formação de ligação de hidrogênio soluto-solvente em meios ricos em água ou DMSO.....	113
Figura 27. O efeito modulador do meio na velocidade das reações do 1MEI e IMZ com DEDNPP devido a diferentes interações solvente-soluto.	116
Figura 28. Perfil cinético em função do pH referente às reações do 4(5)HMZ (0,2 mol L ⁻¹) com DEDNPP e hidrólise espontânea do triéster, a 25 °C.	118
Figura 29. A. Espectro EM (+) obtido durante a reação do 4(5)HMZ a 0,2 mol L ⁻¹ com DEDNPP 7,5x10 ⁻³ mol L ⁻¹ em pH 8,5. B. ESI-MS/MS do sinal em <i>m/z</i> 235 Da e estrutura dos intermediários.	122
Figura 30. Ampliação do espectro de RMN de ³¹ P para a reação de 0,1 mol L ⁻¹ DEDNPP com HMZ a 0,11 mol L ⁻¹ , pH 8,5, 25 °C.....	124
Figura 31. Espectros sucessivos de RMN de ³¹ P{ ¹ H} obtidos da reação do 4(5)HMZ (0,1 mol L ⁻¹) com DEDNPP (7,5x10 ⁻³ mol L ⁻¹) em pH 8,0 a 25 °C.	126
Figura 32. Perfil de concentração vs tempo obtido por RMN de ³¹ P da reação do 4(5)HMZ (0,1 mol L ⁻¹) com DEDNPP.	126
Figura 33. Estruturas dos ET via mecanismo S _N 2(P) referentes à reação do 4HMZ e 5HMZ com DEDNPP em nível B3LYP/6-31G+(d,p).	128
Figura 34. Diagrama de energia livre de ativação (kcal mol ⁻¹) das reações de clivagem do DEDNPP via nitrogênio do 4HMZ e 5HMZ e via oxigênio.	129
Figura 35. Estruturas dos ET via mecanismo S _N 2(P) referentes às reações do 4MOMI e 5MOMI com DEDNPP obtidas com método B3LYP/6-31G+(d,p).	131
Figura 36. Diagrama de energia livre de ativação (kcal mol ⁻¹) das reações de clivagem do DEDNPP do 4MOMI e 5MOMI.	132
Figura 37. Perfil da IRC da reação do 5HMZ com DEDNPP.	133
Figura 38. Variação da energia livre e energia eletrônica da reação do 4HMZ com DEDNPP ao longo da coordenada da reação.	134
Figura 39. Resumo dos resultados obtidos para a reação do 4(5)HMZ com DEDNPP.	135
Figura 40. Estruturas dos ET referentes às reações dos derivados de IMZ com DEDNPP obtidas em nível B3LYP combinado com a função de base 6-31+G(d,p).	138

Figura 41. Diagrama de energia livre de ativação (kcal mol^{-1}) da reação de clivagem do DEDNPP com 2HZ determinado via método B3LYP/6-31+G(d,p).	139
Figura 42. Barreiras de ativação das reações dos derivados de IMZ com DEDNPP (B3LYP/6-31+G(d,p)). Para o 5CIZ $\Delta G^\ddagger=37,2 \text{ kcal mol}^{-1}$, omitida para facilitar a visualização.....	140
Figura 43. Ordem de reatividade do 2HZ, 2AZ e 4HMZ em reação com DEDNPP e estruturas dos ET. Δv e ΔI em relação aos respectivos isômeros de posição.....	143
Figura 44. Derivados de IMZ mais reativos na desfosforilação do DEDNPP e possíveis aplicações.	144
Figura 45. Resumo geral das conclusões desse trabalho.	146

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Propriedades do IMZ, piridina e pirrol.	22
Tabela 2. Derivados de IMZ e seus valores de $pK_{aH}^{2,4}$	25
Tabela 3. Mecanismos de alcoólise e tiólise via fósforo em uma série de organofosfatos.....	52
Tabela 4. Parâmetros cinéticos dos derivados de IMZ na reação com DEDNPP.....	70
Tabela 5. Parâmetros cinéticos e termodinâmicos da reação do MMZ ^a com DEDNPP. ^b	77
Tabela 6. Parâmetros cinéticos e termodinâmicos das reações do xMEI e IMZ com DEDNPP.	89
Tabela 7. Dados referentes às espécies detectadas nas reações dos xMEI com DEDNPP em pH 8,5 ^a a 25 °C, por RMN (600 MHz, H ₂ O/D ₂ O). ^b	91
Tabela 8. Parâmetros cinéticos referentes aos intermediários formados reações do 2MEI e 4(5)MEI com DEDNPP, obtidos pelos perfis mostrados na Figura 20. Os erros estão dados entre parênteses.....	97
Tabela 9. Barreiras de ativação ($\Delta G^\ddagger/kcal\ mol^{-1}$) experimentais e teóricas referentes às reações dos xMEI e IMZ com DEDNPP.	101
Tabela 10. Parâmetros geométricos das espécies envolvidas na reação dos xMEI e IMZ com DEDNPP obtidos com o método B3LYP/6-31+G(d,p). ^a	102
Tabela 11. Energias do orbital sigma contendo o par de elétrons não ligante do nitrogênio (σ_{NLN}) de cada nucleófilos.....	104
Tabela 12. Coeficientes A, B e P referentes aos parâmetros do solvente, obtidos pelos ajustes por regressões múltiplas das constantes de velocidade das reações do DEDNPP com IMZ e 1MEI em misturas DMSO/H ₂ O. ^a Equações 17 a 23 evidenciadas e cada linha, respectivamente.....	110
Tabela 13. Razões mais relevantes entre as constantes de velocidade em diferentes composições da mistura DMSO/H ₂ O. ^a	113
Tabela 14. Parâmetros termodinâmicos referentes às reações do IMZ e 1MEI com DEDNPP em diferentes composições de solventes. ^a	114
Tabela 15. Parâmetros cinéticos e termodinâmicos ^a da reação do 4(5)HMZ a 0,2 mol L ⁻¹ com DEDNPP. ^b	119
Tabela 16. Dados referentes às espécies detectadas nas reações do 4(5)HMZ com DEDNPP ^a por RMN (600 MHz, H ₂ O/D ₂ O). ^b	123

Tabela 17. Deslocamentos químicos relevantes do 4(5)HMZ-INT, x-MIPI, IPI, DEP, TEP e TMP.....	125
Tabela 18. Parâmetros cinéticos referentes ao 4(5)HMZ-INT formado na reação do 4(5)HMZ com DEDNPP, obtidos pelos perfis mostrados na Figura 32.	127
Tabela 19. Frequências (ν) e intensidades (I) de estiramento OH/NH ₂ (B3LYP/6-31+G(d,p)) nos ETs envolvendo os derivados 2HZ, 5HZ, 4HMZ, 5HMZ, 2AZ e 5AZ em reação com DEDNPP e as variações de frequências ($\Delta\nu$) e intensidades vibracionais (ΔI) entre os ETs com e sem ligação de hidrogênio.....	142

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Equilíbrio ácido-base, posições e ressonância do IMZ.....	21
Esquema 2. Equilíbrio tautomérico do IMZ.....	23
Esquema 3. Equilíbrio tautomérico do 4(5)NZ, 4(5)MEI e 4(5)AZ.	24
Esquema 4. Regiosseletividade na reação de acilação do 4(5)fenilimidazol.	24
Esquema 5. IMZ atuando como (i) catalisador ácido, (ii) catalisador básico e (iii) nucleófilo.	27
Esquema 6. IMZ como catalisador nucleofílico e básico geral na clivagem do fenil acetato. ¹⁹	28
Esquema 7. Mecanismos tipo triéster e tipo ácido-base geral de quebra do RNA. ²²	29
Esquema 8. Mecanismo de clivagem da acetilcolina pela AChE ²⁶	30
Esquema 9. Estruturas de moléculas derivadas de IMZ com interesse farmacológico	31
Esquema 10. Classificação dos ésteres de fosfato.	33
Esquema 11. Estruturas de importantes agentes nervosos.	34
Esquema 12. Mecanismo de inibição, envelhecimento e reativação da AChE.	35
Esquema 13. Importantes oximas utilizadas na reativação da AChE.....	36
Esquema 14. Pesticidas organofosforados proibidos ou com restrições ao uso pela Organização Mundial de Saúde ou outras agências nos Estados Unidos e Europa.	37
Esquema 15. Mecanismo de hidrólise de um monoéster de fosfato.	39
Esquema 16. Mecanismo de hidrólise do triéster difenil-2-nitro-fosfato. ⁷³	42
Esquema 17. Posição dos grupos espectadores na estrutura do ET na transferência do grupo fosforila em um triéster de fosfato.	43
Esquema 18. Reações da <i>N</i> -metilhidroxilamina com EDNPP. ⁸¹	45
Esquema 19. Clivagem catalítica intramolecular do 2-carboxifenil fosfato.	45
Esquema 20. Formação do intermediário na reação do dietil flúor-fosfato com histidina.	47
Esquema 21. Mecanismo de clivagem do DEDNPP, EDNPP e BDNPP com IMZ. ¹⁸	48
Esquema 22. Mecanismos de reação da hidroxilamina com um triéster de fosfato e ET do caminho (a). ⁹⁷	53
Esquema 23. Mecanismos de clivagem do triéster TPP e do diéster BPP mediado por hidroxilamina. ¹⁰⁰	54

Esquema 24. Mecanismos propostos de clivagem do diéster BMIPP.....	56
Esquema 25. Estruturas das espécies envolvidas nesse trabalho.	60
Esquema 26. Reações paralelas do DEDNPP em meio aquoso na presença de um nucleófilo.	63
Esquema 27. Tautomerismo do MMZ.	71
Esquema 28. Caminhos propostos para reação do MMZ neutro com DEDNPP.....	72
Esquema 29. Caminhos propostos para reação do MMZ aniônico com DEDNPP...	73
Esquema 30. Mecanismos propostos para a reação do MMZ neutro com DEDNPP via $S_N2(P)$ e S_NAr	82
Esquema 31. Estruturas e equilíbrio tautomérico dos xMEI	87
Esquema 32. Reações do DEDNPP com os xMEI considerando todas as possíveis contribuições em k_{obs}	89
Esquema 33. Mecanismo proposto para a reação dos xMEI com DEDNPP.....	90
Esquema 34. Mecanismo da reação dos tautômeros do 4(5) MEI com DEDNPP. ..	95
Esquema 35. Mecanismos de reação do 1MEI e IMZ com DEDNPP, com destaque para a etapa de desprotonação do IPI, ausente no 1-MIPI.	105
Esquema 36. Equilíbrio tautomérico do 4(5)HMZ.....	117
Esquema 37. Propostas mecanísticas para a reação do 4(5)HMZ neutro com DEDNPP.	120
Esquema 38. Mecanismos propostos para o ataque do oxigênio do 4HMZ ao DEDNPP.	129
Esquema 39. Par tautomérico do 4(5)MOMI e as reações com DEDNPP.	130
Esquema 40. Derivados de IMZ propostos na reação com o DEDNPP.	137

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

IMZ – imidazol	CID - dissociação por colisão induzida
pK_{aH} - cologaritmo da constante de ionização do ácido conjugado	RMN - ressonância magnética nuclear
pK_a - cologaritmo da constante de ionização	TMSP - ácido 3-(trimetilsilil)propionico-D4
4(5)AZ - 4(5)-aminoimidazol	HMBC - experimento de RMN bidimensional de a longa distância
4(5)NZ - 4(5)-nitroimidazol	HSQC - experimento de RMN bidimensional de correlação direta
His12 - histidina-12	CTAB - brometo de cetiltrimetilamônio
His119 - histidina-119	SDS - dodecilsulfato de sódio
CDK - quinases dependentes de ciclinas	DFT - teoria funcional da densidade
AChE – acetilcolinesterase	TGQN - método <i>transit-guided quasi-Newton</i>
DNA – ácido desoxirribonucléico	PCM - polarizable continuum model
RNA - ácido ribonucléico	IRC - coordenada intrínseca da reação
A_D + D_N - mecanismo associativo	SMD - solvation model density
A_DD_N – mecanismo concertado	k_{OH} - constante de velocidade de hidrólise alcalina
D_N + A_D - mecanismo dissociativo	k₀ - constante de velocidade de hidrólise espontânea
RLEL - relações lineares de energia livre	k_N - constante de velocidade do nucleófilo
β - constante de Bronsted	k_{obs} - constante de velocidade observada
ET - estado de transição	k_{não} - constante de velocidade não catalisada
BMIPP - bis(2-(1-metil-1H-imidazol-3-íno-2-il)fenil) fosfato	t_{1/2} – tempo de meia vida
BDNPP - bis(2,4-dinitrofenil) fosfato	ΔG[‡] - variação de energia livre de ativação
EDNPP - etil 2,4-dinitrofenil fosfato	ΔH[‡] - variação de entalpia de ativação
BPP - bis-2-piridil fosfato	ΔS[‡] - variação de entropia de ativação
TPP - tris-2-piridil fosfato	
DEP - dietil-fosfato	
DEDNPP - dietil 2,4-dinitrofenil fosfato	
DNP - 2,4-dinitrofenolato	
EM - espectrometria de massas	
ESI - ionização por <i>electrospray</i>	

RENAME - relação nacional de medicamentos essenciais

ABZ - albendazol

BNZ – benznidazol

MTZ - metronidazol

MMZ - metimazol

MMZnPI - intermediário de reação via ataque do nitrogênio do MMZ ao fósforo

MMZDNP - intermediário de reação via ataque do enxofre do MMZ ao carbono aromático

MMZsPI - intermediário de reação via ataque do enxofre do MMZ ao fósforo

CM - complexo de Meisenheimer

S_N2(P) - substituição nucleofílica bimolecular via fósforo

S_NAr - substituição nucleofílica aromática

xMEI - metilimidazol monossubstituído

1 MEI - 1-metilimidazol

2MEI - 2-metilimidazol

4(5)MEI - 4(5)-metilimidazol

x-MIPI - intermediário fosforilado derivado dos xMEI

1-MIPI - intermediário fosforilado derivado do 1MEI

2-MIPI - intermediário fosforilado derivado do 2MEI

4-MIPI - intermediário fosforilado derivado do 4MEI

5-MIPI - intermediário fosforilado derivado do 5MEI

SA - acidez do meio reacional na Escala de Catalán.

SB - basicidade do meio reacional na Escala de Catalán.

SPP - polaridade/polarizabilidade do meio reacional na Escala de Catalán.

DMSO - sulfóxido de dimetila

4(5)HMZ - 4(5)-hidroximetil-imidazol

4(5)HMZ-INT - intermediário de reação derivado do 4(5)HMZ

4HMZnPI - intermediário de reação via ataque do nitrogênio do 4HMZ

5HMZnPI - intermediário de reação via ataque do nitrogênio do 5HMZ

HMZoPI - intermediário de reação via ataque do oxigênio do MMZ derivado do 4(5)HMZ

4(5)MOMI - 4(5)-metóximetilimidazol

2AZ - 2-aminoimidazol

2HZ - 2-hidroxiimidazol

5AZ - 5-aminoimidazol

5BrZ - 5-bromoimidazol

5ClZ - 5-cloroimidazol

5FZ - 5-fluorimidazol

5HZ - 5-hidroxiimidazol

5IZ - 5-iodoimidazol

5IPZ - 5-isopropilimidazol

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
1.1. A versatilidade química e as propriedades do imidazol e seus derivados	21
<i>1.1.2. As atividades catalítica e farmacológica dos derivados de imidazol</i>	<i>26</i>
1.2. Ésteres de fosfato: importância biológica, pesticidas e armas químicas.	32
<i>1.2.1. Os mecanismos gerais de transferência do grupo fosforila</i>	<i>38</i>
<i>1.2.2. Reações nucleofílicas envolvendo ésteres de fosfato</i>	<i>44</i>
1.3. Cálculos teóricos aplicados às reações de transferência do grupo fosforila e reatividade do imidazol	49
2. OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS.....	59
2.1. Objetivo geral	59
2.2. Objetivos específicos	59
3. MATERIAIS E MÉTODOS	61
3.1. Reagentes	61
3.2. Estudos cinéticos	61
3.3. Espectrometria de massas.....	65
3.4. Ressonância Magnética Nuclear	65
3.5. Cálculos teóricos	66
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
4.1. Reatividade de fármacos derivados de imidazol.....	68
4.1.1. <i>Ensaio para dissolução e estudos cinéticos.....</i>	<i>69</i>
4.1.2. <i>Reatividade do fármaco metimazol.....</i>	<i>71</i>
4.1.2.1. <i>Elucidação mecanística por espectrometria de massas</i>	<i>78</i>
4.1.2.2. <i>Elucidação mecanística por cálculos teóricos</i>	<i>81</i>
4.1.3. <i>Conclusões Parciais</i>	<i>85</i>
4.2. Efeito do substituinte na reatividade do imidazol: metilimidazóis	87
4.2.1. <i>Estudos cinéticos.....</i>	<i>88</i>
4.2.2. <i>Elucidação mecanística por ressonância magnética nuclear.....</i>	<i>91</i>

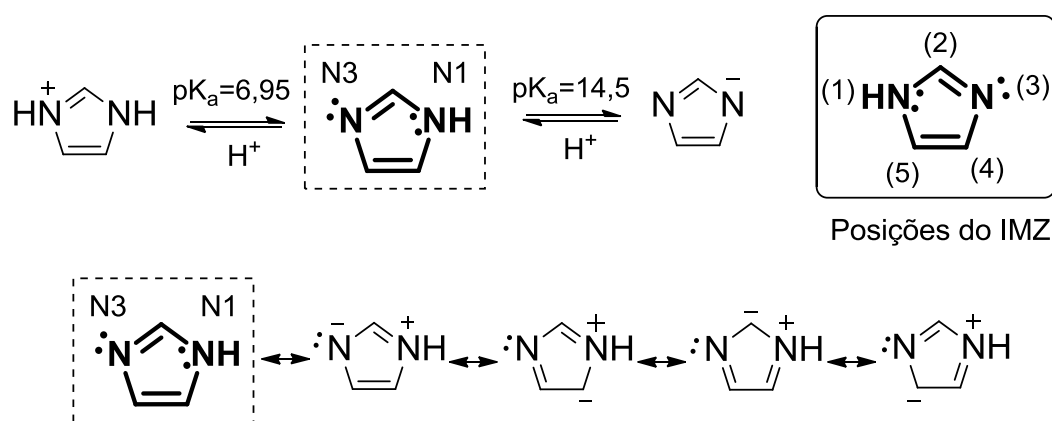
4.2.3. Compreendendo o efeito do posicionamento da metila por cálculos teóricos	99
4.2.4. Conclusões Parciais	105
4.3. O efeito do solvente na reatividade do imidazol e 1-metilimidazol	107
4.3.1. Conclusões Parciais	115
4.4. Efeito do substituinte na reatividade do imidazol: o caso do 4(5)-hidroximetilimidazol	117
4.4.1. Estudos cinéticos	118
4.4.2. Elucidação mecanística por espectrometria de massas	121
4.4.3. Elucidação mecanística por ressonância magnética nuclear.....	123
4.4.4. Cálculos teóricos.....	127
4.4.5. Conclusões Parciais	134
4.5. Design de novos catalisadores através de cálculos teóricos.....	136
4.5.1. Conclusões Parciais	143
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	145
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	147
APÊNDICE	162

1. INTRODUÇÃO

1.1. A versatilidade química e as propriedades do imidazol e seus derivados

O imidazol (IMZ) apresenta estrutura aromática e heterocíclica 1,3-diazólica de cinco membros, com elevada solubilidade em água e outros solventes polares, devido ao seu alto momento de dipolo (3,64D).¹ Quando protonado, a forma catiônica do IMZ apresenta pK_{aH} 6,95² (sendo pK_{aH} a representação do pK_a do ácido conjugado), enquanto sua forma neutra possui pK_a 14,5, levando à formação de espécie desprotonada aniônica (Esquema 1).³

Esquema 1. Equilíbrio ácido-base, posições e ressonância do IMZ.



Como mostrado na Figura 1, o sistema conjugado do IMZ é formado por seis elétrons, populando o orbital molecular resultante da combinação de cinco orbitais p , com nitrogênios atuando de formas diferentes na organização eletrônica. Enquanto o nitrogênio ligado ao hidrogênio (N1, Esquema 1) contribui formalmente com dois elétrons para a ressonância, o outro (N3) apresenta um par de elétrons não ligantes em orbital sigma perpendicular aos orbitais π (Figura 1).⁴ Portanto, no IMZ neutro o nitrogênio desprotonado (N3) é do tipo piridina, visto que pode atuar como base devido a disponibilidade do par eletrônico, enquanto o nitrogênio N1 é do tipo pirrol, por se comportar como ácido fraco (Figura 1). Nesse sentido, considerando as espécies neutras, a ordem de basicidade observada para esses três heterociclos é IMZ > piridina > pirrol (Tabela 1), uma vez que a protonação do pirrol envolve utilização dos elétrons envolvidos no sistema π , levando à perda da aromaticidade. A piridina,

por sua vez, apresenta maior basicidade que o pirrol devido a presença do par de elétrons isolado, entretanto, por possuir apenas um nitrogênio para acomodar a carga positiva originada com a protonação, seu ácido conjugado tem menor estabilidade que a forma catiônica do IMZ (Esquema 1), o que resulta em valor de pK_{aH} mais baixo. Por razão similar, o pirrol apresenta pK_a maior que o IMZ, por apresentar apenas um heteroátomo eletronegativo para suportar carga negativa proveniente da desprotonação, levando a formação de espécie aniônica mais instável que no caso do heterociclo dinitrogenado.

Figura 1. Nitrogênios no IMZ e orbitais moleculares σ (não ligante) e π (aromáticos).

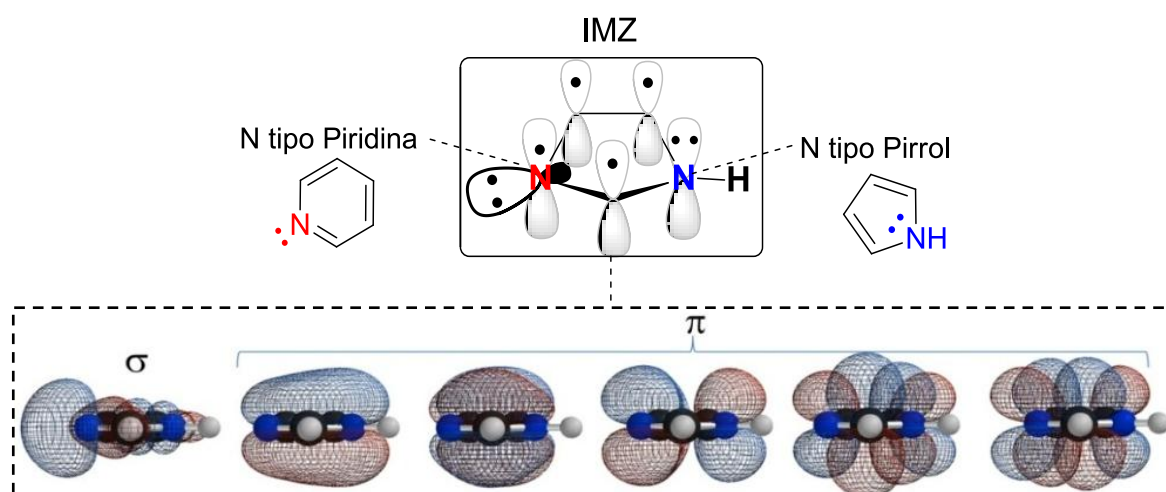


Tabela 1. Propriedades do IMZ, piridina e pirrol.

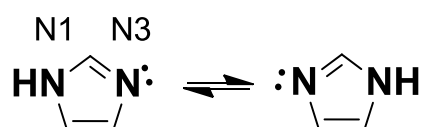
	Momento de dipolo (D) ¹	Ponto de ebulição (°C)	pK_{aH}^1 ($BH^+ \rightarrow B + H^+$)
IMZ	3,64	256 ⁵	6,95 ²
Piridina	2,15	115 ⁶	5,6 ⁷
Pirrol	1,80	130 ⁸	0,4 ⁷

Ainda relacionado à presença simultânea de grupos NH e N:, é importante destacar a capacidade simultânea de doação e recepção de ligações de hidrogênio no IMZ, que ocorrem tipicamente em associações lineares.⁵ Por essa razão, o IMZ apresenta altos pontos de fusão e ebulição em comparação com pirrol e piridina (Tabela 1), que por sua vez apresentam menor capacidade de formação de ligação de hidrogênio.⁹ Vale enfatizar, ainda, que em soluções aquosas próximas da

neutralidade (*i.e.* com valor de pH aproximadamente 7,0 a 25 °C), o IMZ apresenta equivalentes populações de espécies protonadas e desprotonadas, e esse caráter anfótero permite que atue com versatilidade em sistemas reacionais.⁷

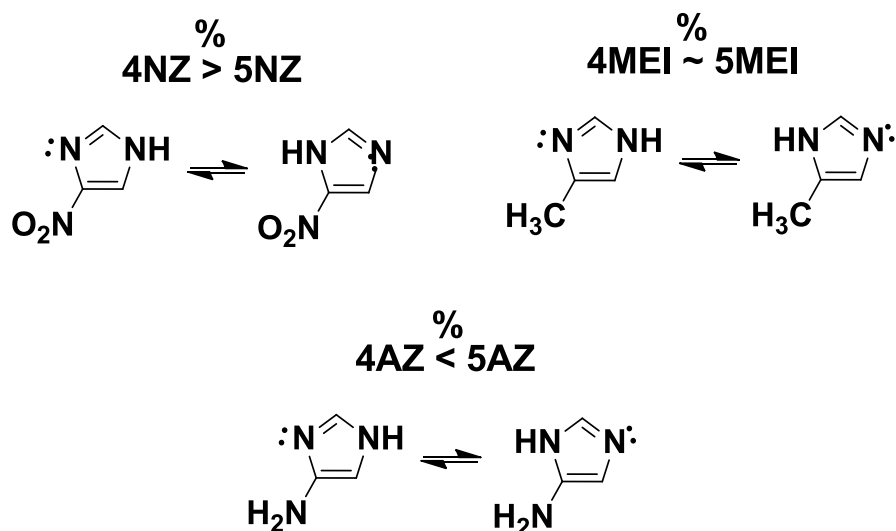
Uma importante consequência resultante da presença de nitrogênios com diferentes contribuições eletrônicas no IMZ é a ocorrência de equilíbrio tautomérico.¹⁰ Em solução com disponibilidade de prótons, esse processo acarreta na alternância de funções entre os nitrogênios. Assim, a protonação do átomo N3 o induz a participar da deslocalização eletrônica enquanto que, simultaneamente, a desprotonação do átomo N1 torna-o básico/nucleofílico, como mostrado no Esquema 2.

Esquema 2. Equilíbrio tautomérico do IMZ.



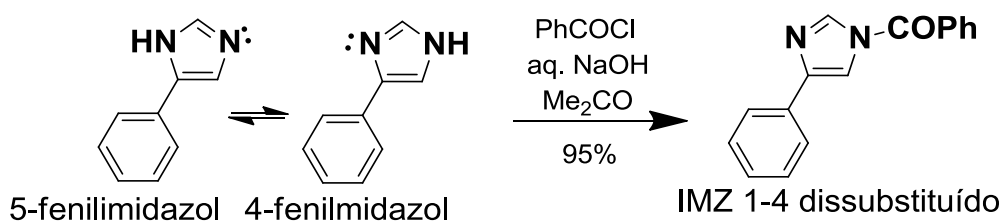
Cabe mencionar que o par tautomérico do IMZ é formado por duas espécies idênticas, assim como no caso de seus derivados substituídos na posição 2, enquanto a inclusão de substituinte na posição 1 leva o IMZ à perda do tautomerismo.⁴ Um caso especial é observado nos imidazóis assimétricos substituídos na posição 4, que coexistem em solução com as respectivas espécies substituídas em 5. Essas duas espécies diferentes formam um equilíbrio tautomérico resultante da alternância do próton entre os nitrogênios, sendo que a natureza do substituinte influencia diretamente na população de cada tautômero.^{11,12} Estudos nesse sentido tem mostrado, por exemplo, que no equilíbrio tautomérico do 4(5)-nitroimidazol (4(5)NZ), o 4-nitroimidazol (4NZ) é predominante (Esquema 3), sendo a principal razão atribuída à maior capacidade de solvatação, resultante da maior polaridade em relação ao 5-nitroimidazol (5NZ).¹³ Em contrapartida, tem-se observado que grupos eletrodoadores tendem a tornar o equilíbrio mais igualitário, como no caso do 4(5)metilimidazol (4(5)MEI)¹⁴ ou até mesmo mais favorável ao derivado substituído em 5, como no 4(5)aminoimidazol (4(5)AZ).¹²

Esquema 3. Equilíbrio tautomérico do 4(5)NZ, 4(5)MEI e 4(5)AZ.



Outra implicação associada à presença de tautômeros assimétricos é a regioseletividade, como mostrado em um estudo envolvendo a reação de acilação do 4(5)fenilimidazol, apresentado no Esquema 4. Foi constatado que o 5-fenilimidazol apresenta a maior reatividade no equilíbrio tautomérico, visto que apresenta o substituinte em posição 5 e, portanto, exerce menor efeito estérico no nitrogênio nucleofílico do IMZ, comparado ao seu par com a fenila na posição 4. Assim, o produto dissustituído 1-4 é obtido com 95% de rendimento, como mostrado no Esquema 4.¹⁵

Esquema 4. Regioseletividade na reação de acilação do 4(5)fenilimidazol.



Estudos relacionados ao efeito do substituinte na acidez e basicidade do IMZ tem mostrado que, de forma geral, há comportamento similar àqueles observados em fenóis e anilinas, em que grupos eletroretiradores, tais como fenila, nitro e halogênios, tendem a diminuir o seu pK_{aH} , enquanto grupos alquila o tornam mais

básicos, como mostrado na Tabela 2.⁴ Além disso, a influência torna-se maior de acordo com o aumento na quantidade substituintes, como observado para os derivados 2-metilimidazol (2MEI), 2,(4)5-dimetilimidazol e 2,4,5-trimetilimidazol, com pK_{aH} 7,85, 8,5 e 8,92, respectivamente.

Tabela 2. Derivados de IMZ e seus valores de pK_{aH} .^{2,4}

Derivado	Estrutura	pK_{aH}	Derivado	Estrutura	pK_{aH}
IMZ		6,95	Histidina		6,00
2-nitroimidazol		-0,81	1MEI		7,21
4(5)NZ		-0,05	2MEI		7,85
2-bromoimidazol		3,85 ¹⁶	4(5)MEI		7,69
4(5)-bromoimidazol		3,60	2,(4)5-dimetilimidazol		8,5
benzimidazol		5,53	2,4,5-trimetilimidazol		8,92
2-fenilimidazol		6,48	1-etilimidazol		7,26
4(5)-fenilimidazol		6,10	2-etilimidazol		7,99

Fonte: Lenarcik, 2002 e Matuszak, 1976.

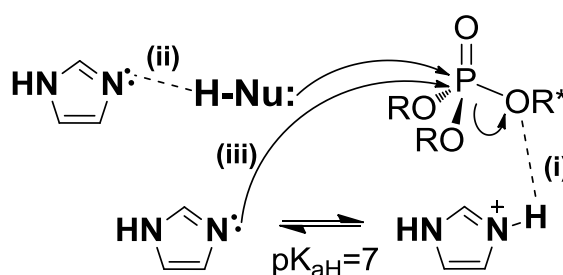
Outro detalhe importante relacionado aos dados da Tabela 2 é a dependência da basicidade do derivado de IMZ em função do posicionamento de um determinado grupo. Comparando os imidazóis monossustituídos, pode-se notar que, exceto para

os nitroderivados, um maior valor de pK_{aH} do anel é observado quando o substituinte encontra-se na posição 2, com destaque para os derivados etilados, em que se observa a maior diferença de pK_{aH} (0,73 unidade). Esse comportamento se repete para os substituintes fenila, etila, e bromo, com derivados contendo o grupo na posição 2 sendo significativamente mais básicos que seus isômeros, sendo observado, por exemplo, no caso dos metilimidazóis, que a basicidade segue a ordem 2MEI>4(5)MEI>1-metilimidazol (1MEI). Vale destacar, portanto, que esses valores são indicativos de que derivados contendo substituintes na posição 2, por apresentarem maior basicidade, também devem apresentar maior nucleofilicidade. De fato, em um estudo teórico envolvendo uma série de derivados de IMZ monossustituídos,¹⁷ foi mostrado que grupos eletrodoadores aumentam a nucleofilicidade do nitrogênio “tipo piridina” do IMZ, principalmente se estiverem na posição 2 do anel e, portanto, esses resultados estão em consonância com valores de pK_{aH} apresentados na Tabela 2. Em contrapartida, também foi mostrado que grupos eletroretiradores atuam diminuindo a reatividade, sendo esse efeito minimizado se o substituinte estiver na posição 5.¹⁷ Cabe ressaltar que, nesse estudo, os derivados não foram avaliados em reações, sendo considerados apenas fatores dependentes da estrutura eletrônica dos compostos.¹⁷

1.1.2. As atividades catalítica e farmacológica dos derivados de imidazol

Como mencionado, a presença de um nitrogênio tipo piridina e outro tipo pirrol na estrutura do IMZ, confere ao anel propriedades catalíticas versáteis, como ilustrado no Esquema 5, podendo atuar como: (i) catalisador ácido, enquanto protonado, estabilizando grupos de saída ou estados de transição (ET); (ii) catalisador básico, auxiliando ataques de outros nucleófilos pelo recebimento de ligações de hidrogênio no nitrogênio desprotonado ou (iii) como o próprio nucleófilo, utilizando o par de elétrons não ligante para formar ligações covalentes com átomos eletrofílicos.¹⁸

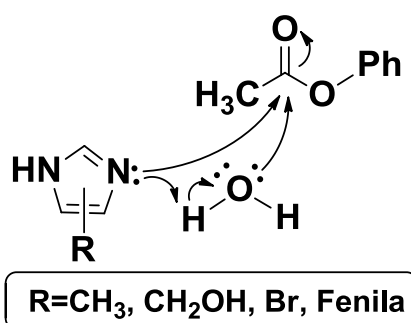
Esquema 5. IMZ atuando como (i) catalisador ácido, (ii) catalisador básico e (iii) nucleófilo.



Atrelado ao caráter multifuncional do grupo IMZ e ao sinergismo causado por substituintes, estudos tem sido realizados visando avaliar as propriedades catalíticas desses compostos. Nesse sentido, Bruice e Schmir mostraram através de estudos cinéticos que a hidrólise de acetatos fenílicos *para*-substituídos é catalisada por derivados de IMZ 4(5)-monossustituídos,¹⁹ sendo apresentados incrementos catalíticos de até 10^5 vezes, comparado ao processo não catalisado. Foi relatado, ainda, que a atividade catalítica cresce em função do aumento do pK_{aH} do derivado de IMZ, sendo a ordem de reatividade dos substituintes correspondente a: $-CH_3 > H > -CH_2OH > Fenila > Br$, porém sem distinções acerca da reatividade das espécies em cada par tautomérico. Sugeriram um mecanismo em que o IMZ atua como nucleófilo com ataque à carbonila e também como catalisador básico geral, auxiliando o ataque da água pela abstração do próton, gerando hidroxila (Esquema 6).¹⁹ Em trabalho correlato, Neuvonen avaliou a clivagem nucleofílica de fenil acetatos mediada por alguns derivados metilados de IMZ, sendo mostrado que o efeito causado pela metila é maximizado quando presente na posição 2 (2MEI). Já o IMZ e o 1MEI apresentaram menor reatividade, respeitando a ordem $2MEI > 1MEI \sim IMZ$.²⁰ No entanto, detalhes acerca da influência do tautomerismo na reatividade também não foram abordados, sendo importante principalmente no caso dos imidazóis assimétricos. Esses trabalhos apresentam resultados que estão diretamente relacionados com a basicidade de cada nucleófilo, sugerindo que maiores valores de pK_{aH} resultam em maior reatividade (Tabela 2), além de destacar a eficiência catalítica desses compostos. Cabe ressaltar, porém, que essa correlação entre reatividade e basicidade ainda não está completamente estabelecida, visto que em outros estudos observou-se, por exemplo, que 1MEI tem menor reatividade que IMZ em reações de desacilação, apesar do seu maior pK_{aH} .¹⁹ De fato, um comportamento antagônico foi observado nas reações estudadas no presente

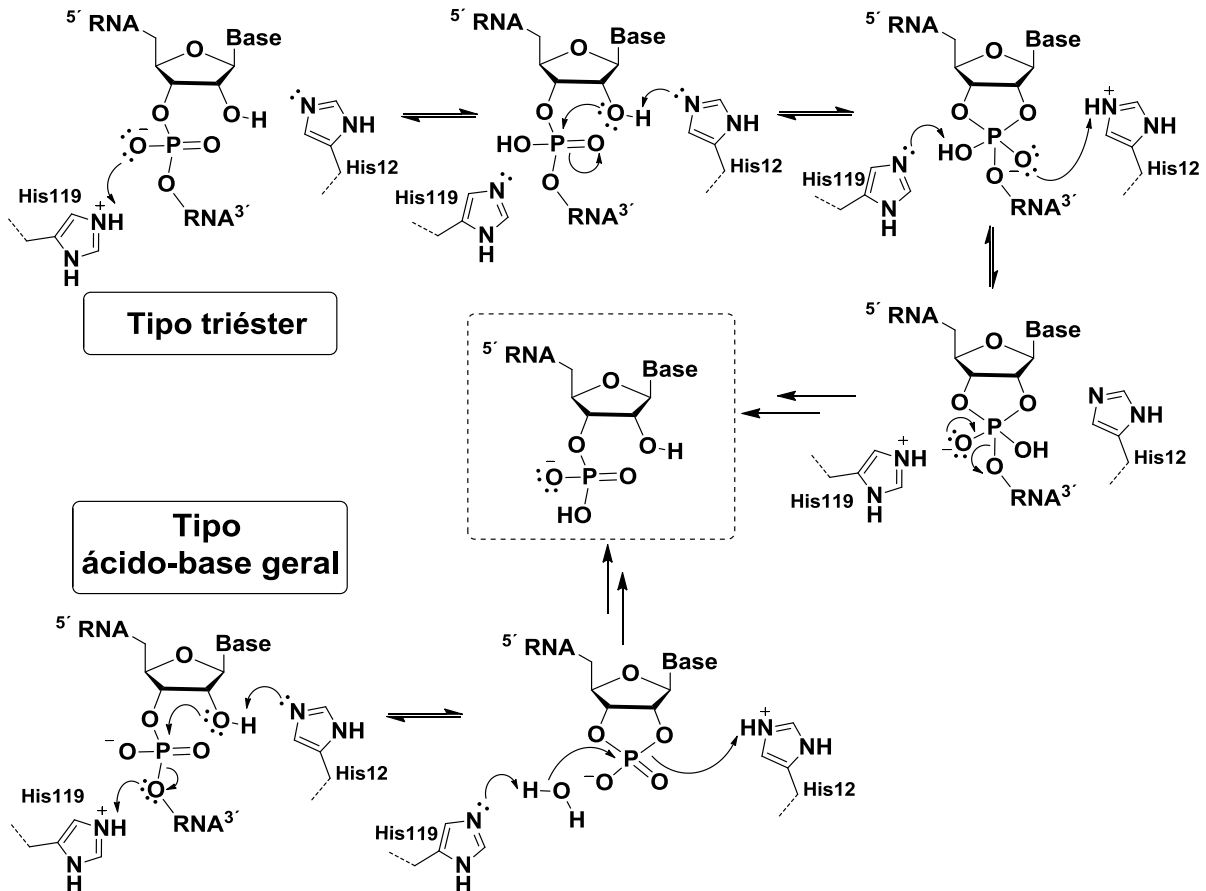
trabalho, evidenciando que outros fatores além da basicidade devem ser considerados.

Esquema 6. IMZ como catalisador nucleofílico e básico geral na clivagem do fenil acetato.¹⁹



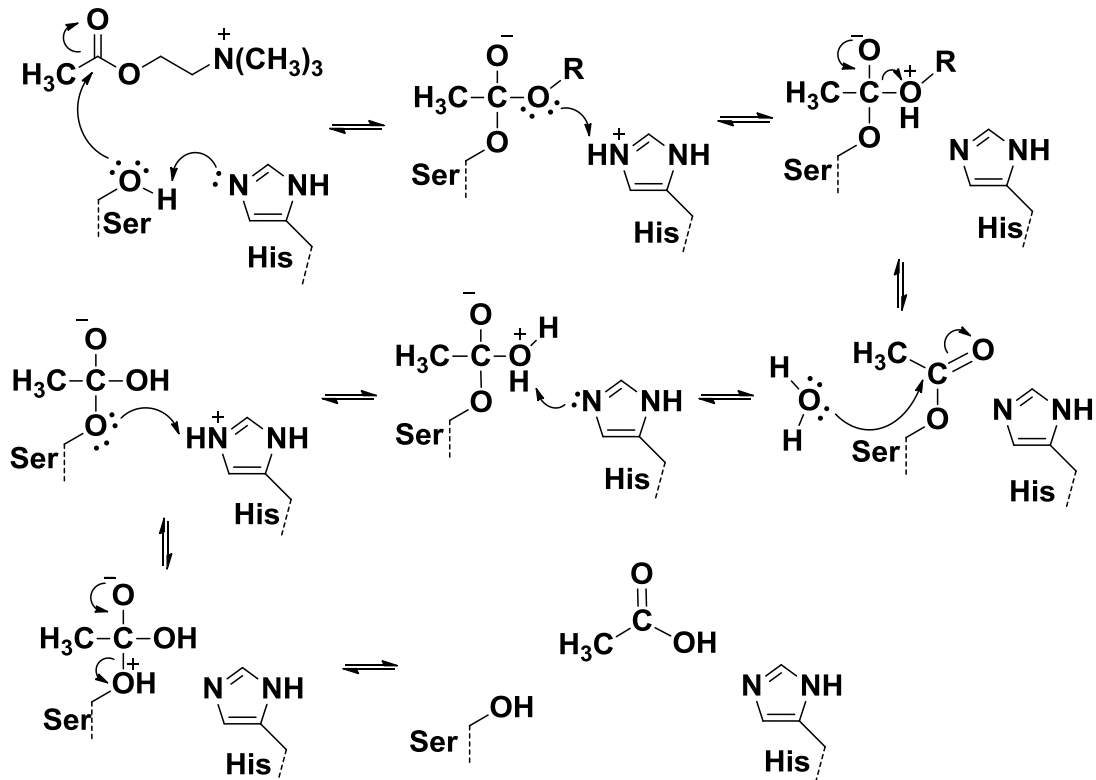
No organismo, a alta versatilidade catalítica do IMZ é utilizada pelo resíduo histidina, um alfa aminoácido presente em várias enzimas, onde o anel atua promovendo diversos processos biológicos. Nas ribonucleases, por exemplo, o IMZ presente no sítio ativo da enzima tem função de catalisar reações de desfosforilação, podendo-se destacar a quebra do RNA, etapa importante na síntese de proteínas.²¹ Existem dois mecanismos propostos para esse processo, como mostrado no Esquema 7, sendo um deles do tipo ácido-base geral e outro tipo triéster.²² Nas etapas iniciais do mecanismo tipo ácido-base geral, o grupo IMZ da histidina-12 (His12) atua como catalisador básico, auxiliando a hidroxila na transfosforilação do RNA, enquanto o IMZ da histidina-119 (His119) age como catalisador ácido, por meio de doação de ligação de hidrogênio, favorecendo a liberação do grupo abandonador.²² Posteriormente, na hidrólise, ocorre inversão das funções dos anéis de IMZ em relação a etapa inicial do processo, ou seja, a His119, antes doadora de prótons, agora se comporta como catalisador básico, enquanto a His12 torna-se o catalisador ácido, sendo que no início do processo atuava abstraindo o próton. Estudos cinéticos envolvendo substituição isotópica e troca de substituintes tem apontado esse mecanismo concertado como preferencial, em detrimento daquele tipo triéster, em que há formação de intermediário pentacoordenado.^{23,24}

Esquema 7. Mecanismos tipo triéster e tipo ácido-base geral de quebra do RNA.²²



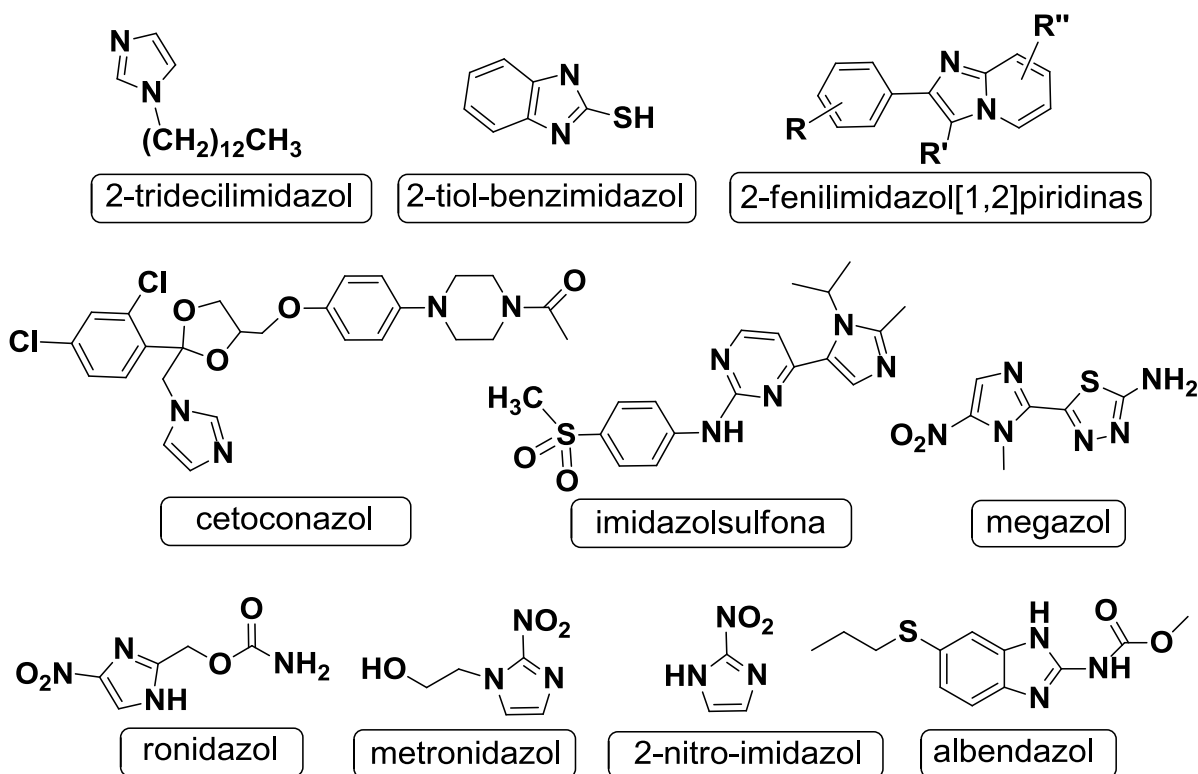
Além das ribonucleases e inúmeras outras biomoléculas, o anel de IMZ está presente no sítio ativo da acetilcolinesterase (AChE), uma enzima da classe das serino hidrolases que é responsável pela hidrólise da acetilcolina, um importante neurotransmissor associado a múltiplas funcionalidades no organismo, incluindo contrações musculares e memória.²⁵ De forma similar à transfosforilação do RNA, a clivagem da acetilcolina ao ácido carboxílico e ao álcool correspondentes é também auxiliada pelo IMZ no papel de catalisador ácido/base, durante todo processo, como mostrado no Esquema 8.²⁶ O mecanismo consiste no ataque nucleofílico pelo oxigênio do grupo OH da serina à carbonila da acetilcolina, favorecido pelo IMZ da histidina atuando como catalisador básico, que abstrai o próton, levando à formação do intermediário tetraédrico. Na etapa seguinte o anel de IMZ se comporta como catalisador ácido, beneficiando a saída do grupo OR. Posteriormente ao ataque nucleofílico da água ao éster resultante, o IMZ volta a atuar consecutivamente como catalisador básico e ácido, mediando a transferência do próton no novo intermediário tetraédrico, levando à última etapa referente à regeneração da serina e formação do ácido carboxílico.

Esquema 8. Mecanismo de clivagem da acetilcolina pela AChE²⁶



A versatilidade e eficiência catalítica em sistemas biológicos tem justificado o crescente interesse em fármacos derivados de IMZ, com destaque para antifúngicos, antibióticos, antissépticos e, mais recentemente, até mesmo antineoplásicos.^{27,28} Alguns dos primeiros estudos sobre a influência de substituintes do anel de IMZ na atividade farmacológica datam da década de 40, como o de Kyrides e colaboradores, que sintetizaram uma série de 2-alkilimidazóis e descobriram que a ação no combate à malária em testes com patos mostrou-se dependente do tamanho da cadeia alquílica, tendo como modelo o 2-tridecilimidazol (Esquema 9), derivado mais ativo.²⁹ Bywater *et al* realizaram um estudo sobre agentes antitireóides em ratos e concluíram que dentre os 26 derivados de IMZ sintetizados e testados, o 2-tiol-benzimidazol (Esquema 9) foi o que apresentou maior atividade.³⁰ Na década de 60, a ação anti-inflamatória de derivados de bi e tri-cíclicos (e. g. Esquema 9), foi investigada por Almirant e colaboradores, sendo que vários mostraram-se fármacos em potencial.³¹⁻³³ Esses e outros estudos de base tornaram possível a estruturação de importantes fármacos derivados de IMZ,²⁸ com destaque ao cetoconazol (Esquema 9), um antifúngico introduzido no mercado na década de 70, sendo ainda amplamente utilizado sem alterações na estrutura.²⁸

Esquema 9. Estruturas de moléculas derivadas de IMZ com interesse farmacológico



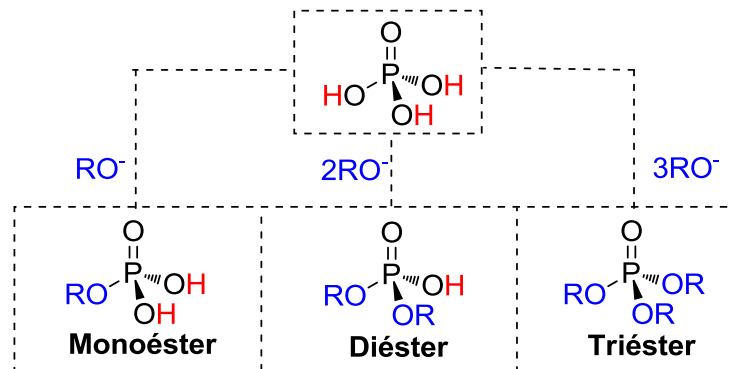
Cabe destacar ainda outros fármacos com origem na década 70, como o albendazol, utilizado como antiparasitário, e o benznidazol, administrado em casos de doença de Chagas.³⁴ Nos últimos anos, o desenvolvimento de inibidores de quinases dependentes de ciclinas (CDK) tem atraído atenção, por se tratar de uma família de proteínas com função importante na proliferação celular, inclusive as cancerígenas.³⁵ Alguns derivados de IMZ tem se mostrado inibidores de CDK, tais como imidazolsulfona (Esquema 9) e seu derivado formado pela substituição da sulfona por piperazina.³⁶ Em contrapartida aos benefícios farmacológicos de derivados de IMZ, estudos *in vitro* e *in vivo* tem mostrado alarmantes efeitos mutagênicos causados por drogas derivadas de nitroimidazóis de uso cotidiano, como o ronidazol, metronidazol, 2-nitroimidazol (Esquema 9), dentre outros.³⁷⁻³⁹ Assim, devido aos efeitos colaterais, estruturas nitro-aromáticas não são a primeira escolha no desenvolvimento de novas drogas, entretanto, recentemente foi relatado que para o Megazol (Esquema 9), essa desvantagem é contrabalanceada pela sua alta eficiência no combate ao *Trypanosoma cruzi*, sendo, portanto, seu uso recomendado em situações críticas.⁴⁰

As notáveis propriedades de derivados IMZ tem motivado sua utilização no desenvolvimento de compostos, seja com aplicações catalíticas ou farmacológicas. Os estudos nesse sentido tem evidenciado, também, que a compreensão da influência dos substituintes na reatividade do IMZ ainda requer estudos de base, ou seja, avaliações detalhadas e sistemáticas do efeito causado por grupos nas diferentes posições do anel.

1.2. Ésteres de fosfato: importância biológica, pesticidas e armas químicas.

Ésteres de fosfato (ou organofosfatos) representam uma ampla classe de substâncias orgânicas contendo grupos alquila ou arila, resultantes da substituição de um ou mais hidrogênios do ácido fosfórico por meio de reações de esterificação, e podem ser classificados em mono-, di- ou triésteres, conforme mostrado no Esquema 10. Os mono e diésteres de fosfato tem papel fundamental em sistemas biológicos,⁴¹ presentes na composição do DNA, RNA e coenzimas,⁴² sendo importantes também na reserva de energia.⁴⁵ Além disso, processos biológicos envolvendo a transferência do grupo fosforila são responsáveis pela transmissão de informação genética,⁴³ além da sinalização e regulação da atividade celular,⁴⁴ como ilustrado anteriormente nos Esquemas 7 e 8 com as enzimas ribonucleases e AChE. Nesse contexto, diante do papel fundamental das reações de transferência do grupo fosforila no organismo, estudos de reações-modelo não enzimáticas com ésteres de fosfato são importantes para uma melhor compreensão dos mecanismos desses processos nos complexos sistemas biológicos. Cabe ressaltar que muitos fármacos e enzimas artificiais são desenvolvidos com base no conhecimento profundo dessas reações. O envolvimento específico dos mono e diésteres de fosfato em processos biológicos tem origem na alta estabilidade das ligações P-O, que garante a preservação do DNA e assegura a transmissão da informação genética.⁴⁵ Para fins comparativos, pode-se destacar, por exemplo, a hidrólise espontânea de um diéster, que tipicamente supera 13 milhões de anos, enquanto que o mesmo processo observado para um éster carboxílico, no qual ocorre quebra da ligação C-O, ocorre com velocidade 3 milhões de vezes maior, evidenciando a alta estabilidade dos ésteres de fosfato.⁴⁶ Portanto, pode-se considerar que caso as ligações P-O fossem mais susceptíveis à clivagem, a evolução poderia ter tomado um caminho diferente na organização molecular.

Esquema 10. Classificação dos ésteres de fosfato.

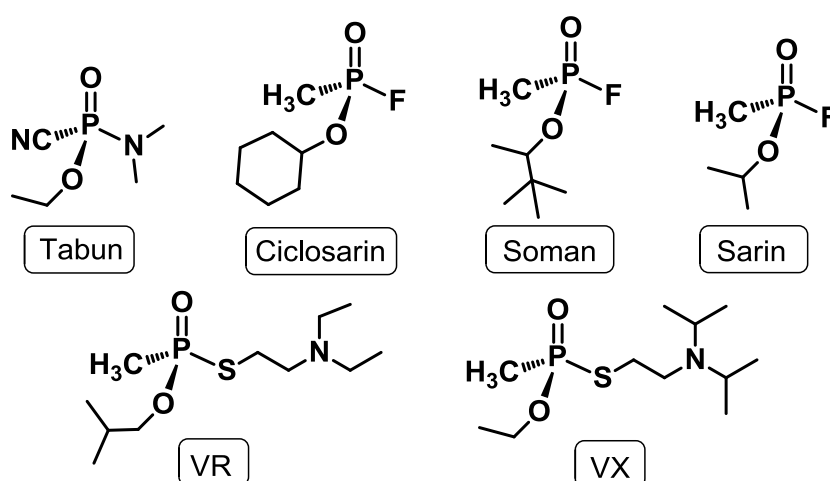


Diferentemente dos mono e diésteres de fosfato, os triésteres não estão presentes naturalmente nos sistemas biológicos. Todavia, em decorrência de sua estabilidade inerentemente alta e da afinidade com moléculas com funções essenciais nos organismos vivos, os triésteres de fosfato são uma classe de compostos amplamente utilizada como pesticidas, inseticidas e até mesmo armas de guerra.⁴⁷ De fato, essas propriedades não apenas tornam os triésteres muito tóxicos, mas também os permitem atingir seu alvo de atuação sem sofrer degradação por fatores ambientais.^{48,49} Dentre outros fatores, a alta toxicidade dos triésteres e outros compostos organofosforados similares, se deve ao seu poder de inibição da enzima AChE, que resulta no acúmulo da acetilcolina, causando estímulos contínuos dos músculos e colapso do sistema nervoso central, podendo levar à morte.^{48,50} Cabe ressaltar que esse processo é o mesmo para humanos, outros mamíferos e até mesmo para insetos, e que armas químicas se diferem de pesticidas basicamente pela potência da letalidade, ou seja, as diferenças moleculares nos aceptores da AChE em cada animal levam a distintas toxicidades.⁵¹

As armas químicas que atuam na inibição da AChE são classificadas como agentes nervosos, apresentados no Esquema 11, tendo Tabun como seu primeiro representante, descoberto pelo químico alemão Gerhard Schrader a partir de pesquisas relacionadas ao desenvolvimento de novos pesticidas, durante a década de 30 do século passado.^{50,52} Até o final da segunda guerra, Schrader e colaboradores já haviam sido responsáveis pela síntese de mais de 2000 compostos organofosforados, incluindo o pesticida, Paraoxon, além de outros agentes nervosos da série G – classificados assim por terem sido desenvolvidos na Alemanha – o Sarin e Soman.^{47,53,54} Cabe ressaltar que esses compostos são comumente

denominados “gases” de guerra, porém são líquidos incolores a temperatura ambiente, com ponto de ebulição acima dos 150 °C.⁵⁰ Dentre outros agentes nervosos, destaca-se também o ciclosarin, também de origem alemã, o VX, sintetizado na Inglaterra em 1950 porém nunca utilizado em guerra, e o VR, conhecido como VX russo, desenvolvido na União Soviética no final da década de 50.^{53,54} Quando o organismo é exposto a agentes nervosos, o processo de inibição e envelhecimento da AChE pode ocorrer rapidamente, com tempos de meia vida de, por exemplo, 36,5 horas para o VX, ou muito menores, chegando a apenas 2 minutos, como no caso do Soman.^{52,55} Logo após a segunda guerra mundial, houve ampliação no escopo das pesquisas relacionadas aos organofosforados, visando não apenas o desenvolvimento de armas químicas, mas também métodos de degradação dessas substâncias nocivas.

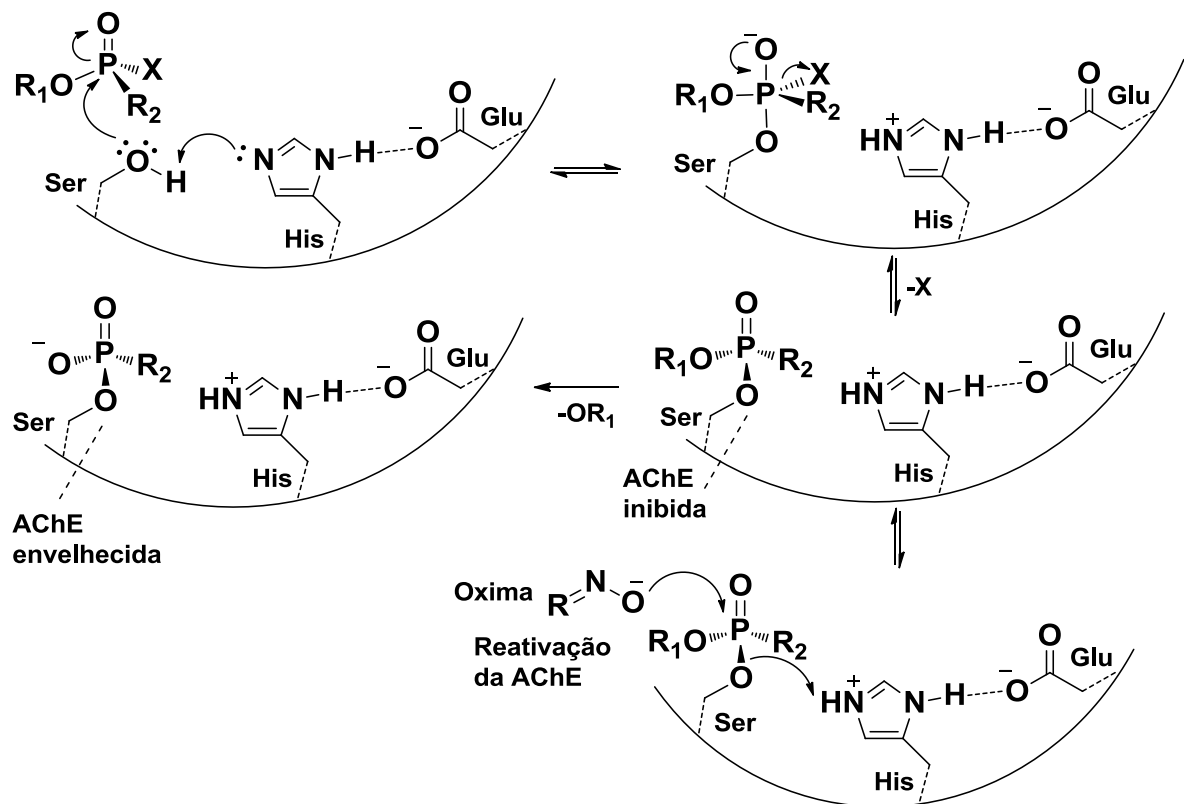
Esquema 11. Estruturas de importantes agentes nervosos.



O mecanismo de inibição da AChE, apresentado no Esquema 12, tem etapa inicial similar ao da hidrólise da acetilcolina (Esquema 8), no qual o grupo OH da serina atua como nucleófilo enquanto os outros grupos da tríade – IMZ e glutamato – atuam como catalisadores básico e ácido, respectivamente.⁵⁰ Por meio de cálculos teóricos foi possível mostrar que, em detrimento a um caminho concertado, o mecanismo é compatível com processo de adição-eliminação, sendo a adição a etapa determinante, como mostrado no Esquema 12.⁵⁶ Após o ataque nucleofílico pelo grupo OH, há a formação de nova ligação O-P entre a serina e o organofosforado, levando ao intermediário pentacoordenado. Posteriormente, com a remoção do grupo abandonador, ocorre a formação da enzima inibida com

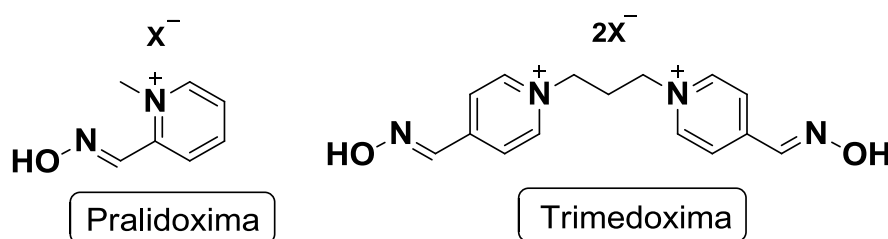
geometria tetraédrica (serina fosforilada).⁵⁰ A inibição ocorre devido a alta estabilidade da nova ligação P-O formada entre a serina e o organofosforado e, conseqüentemente, impossibilita a reação de hidrólise da acetilcolina, levando ao seu acúmulo. Nesse momento podem ocorrer dois caminhos distintos: (i) o envelhecimento da AChE devido a reação de desalquilação, que resulta na formação de um éster aniônico de maior estabilidade e, portanto, maior dificuldade de reativação ou (ii) a reativação espontânea da enzima por meio de reação de desfosforilação promovida pelo próprio organismo. Em casos de intoxicação por essas substâncias, o tratamento médico mais comum de reativação da enzima é baseado no uso de antídotos, que devem ser administrados imediatamente. Esses antídotos são tipicamente constituídos por alguma oxima piridínica, uma classe de compostos que possui alta reatividade com organofosforados e, portanto, tendem a eliminar os agentes nervosos da enzima que ainda não foi envelhecida,⁵⁷ como mostrado na etapa de reativação no mecanismo do Esquema 12.

Esquema 12. Mecanismo de inibição, envelhecimento e reativação da AChE.



Algumas das oximas mais comuns estão mostradas o Esquema 13. Cabe ressaltar que ainda não há um antídoto ideal para esse propósito, visto que oximas apresentam deficiências relacionadas à eficiência, seletividade e toxicidade,⁵⁰ evidenciando a necessidade de maior atenção destinada ao desenvolvimento de novos agentes que promovam processos de desfosforilação.

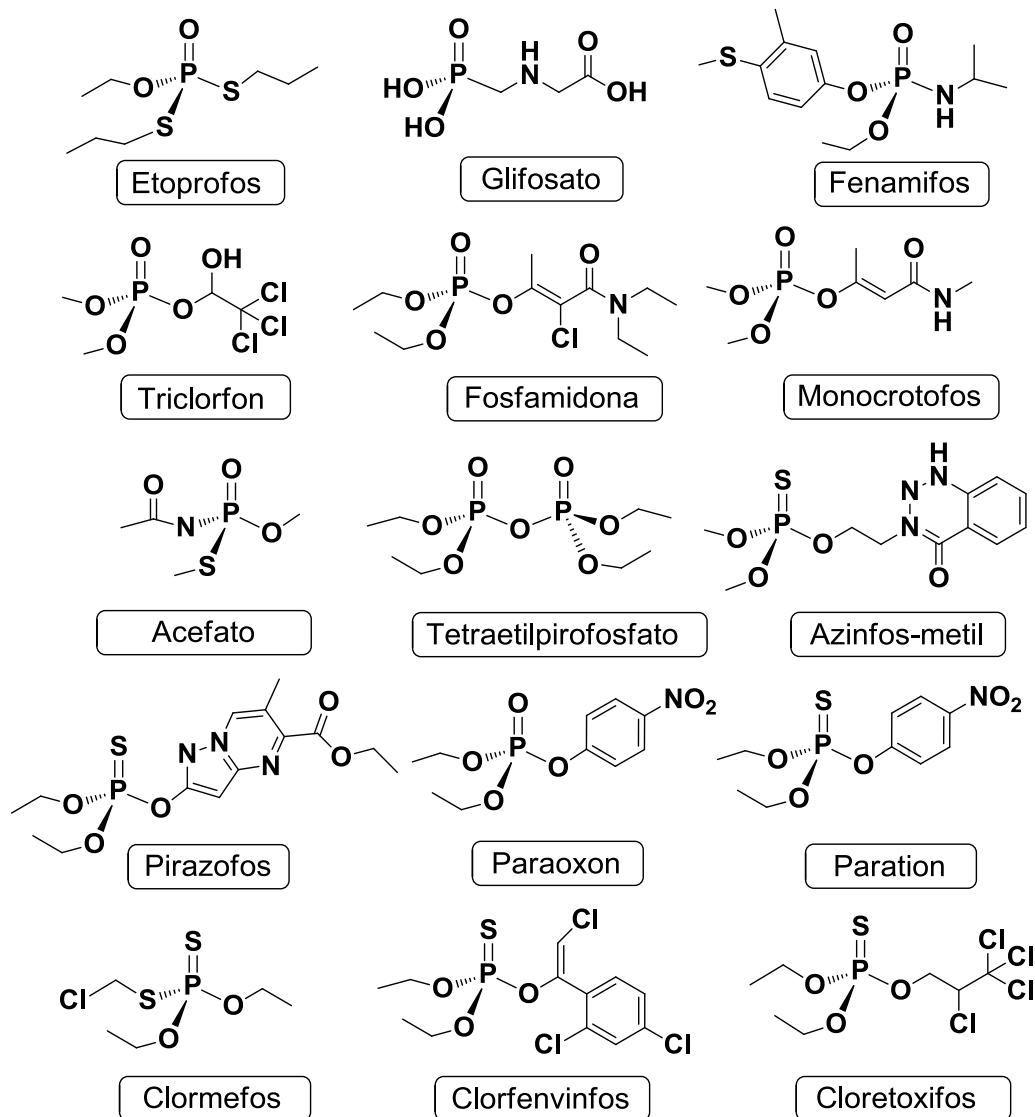
Esquema 13. Importantes oximas utilizadas na reativação da AChE.



Desde que Voegeli sintetizou o trietilfosfato, o primeiro triéster de fosfato em 1848, e Clermont produziu o tetraetilpirofosfato, o primeiro organofosforado inibidor de AchE em 1854 (Esquema 14), o desenvolvimento de novos pesticidas e armas químicas tem evoluído concomitantemente e, como mencionado, houve importante avanço na década de 40 devido ao grande interesse bélico.⁴⁷ De fato, a consolidação de organofosforados como classe de pesticidas ocorreu já na década de 60, com a comercialização do paration (Esquema 14), composto também sintetizado por Schrader durante a segunda guerra.⁵⁸ Posteriormente, houve um surpreendente aumento da demanda desses compostos, levando os organofosforados a representarem cerca de 40% do mercado global de pesticidas, sendo que esse sucesso é atribuído ao baixo custo, versatilidade, estabilidade, considerável eficácia e facilidade de produção.⁵⁹ Entretanto, a popularização e produção excessiva desses compostos atraiu atenção da comunidade científica, que tem mostrado os graves impactos causados por organofosforados na saúde e no meio ambiente, em contraste ao papel importante na produção de alimentos. Cabe ressaltar que, ao lado de medicamentos, pesticidas aparecem como principal agente químico responsável por intoxicação humana, sendo letal em 3% dos casos. Porém, esses dados são ainda mais alarmantes, pois se estima que 98% dos casos de intoxicação não sejam notificados, ou são feitos erroneamente, enfatizando o grave problema de saúde pública relacionado ao consumo de agrotóxicos.⁶⁰ Dentre os sintomas crônicos, tem sido observados efeitos neurológicos, carcinogênicos,

mutagênicos, endócrinos e tóxico-reprodutivos, enquanto os sintomas agudos mais comuns em indivíduos intoxicados compreendem espasmos musculares, vômitos e até convulsões.⁶¹ Devido ao avanço científico visando controle dessas substâncias, diversas tem sido banidas por comprovadamente representarem riscos à saúde da população ou por apresentarem outras restrições ao uso, com base nos critérios da Organização Mundial de Saúde e de agências reguladoras da Europa e Estados Unidos.^{62,63} Algumas estruturas de pesticidas organofosforados banidos estão mostradas no Esquema 14.

Esquema 14. Pesticidas organofosforados proibidos ou com restrições ao uso pela Organização Mundial de Saúde ou outras agências nos Estados Unidos e Europa.



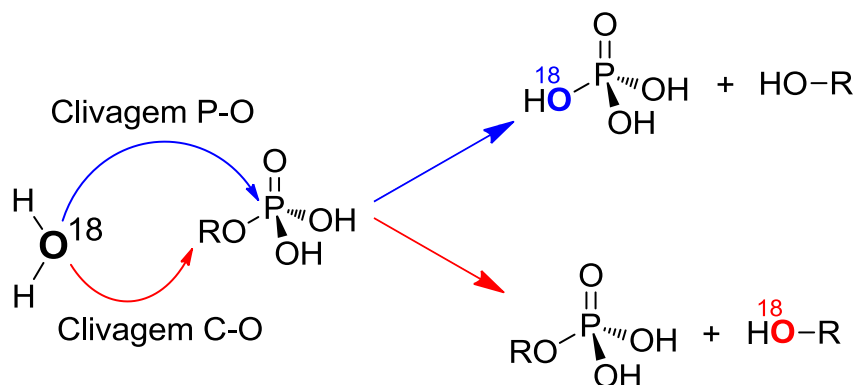
Diversos pesticidas proibidos em outros países ainda são amplamente utilizados no Brasil, podendo-se destacar o acefato, glifosato e o paration (Esquema 14).⁶⁴ De forma agravante, em 2012 o Brasil se tornou o maior consumidor de agrotóxicos no mundo,⁶³ sendo responsável por uma parcela de 19% do mercado, com surpreendentes 1,05 bilhões de litros pulverizados nas lavouras cultivadas naquele ano.⁶⁴ Devido à produção desproporcional dessas substâncias, o acúmulo de estoques de pesticidas obsoletos tem demandado necessidade ainda maior no desenvolvimento de processos visando a detoxificação química. Portanto, a busca por catalisadores eficientes para reações de desfosforilação, ou seja, que permitam a degradação do organofosforado a outros produtos de menor toxicidade tem fundamental importância para o controle dessas substâncias. Nesse sentido, para o avanço no desenvolvimento de agentes detoxificantes, estudos da arquitetura molecular vinculados à compreensão mecanística das reações envolvendo organofosforados podem representar uma importante ferramenta.

1.2.1. Os mecanismos gerais de transferência do grupo fosforila

As reações envolvendo transferência do grupo fosforila de ésteres de fosfato tem sido tema de diversos estudos visando a compreensão dos mecanismos em processos biológicos, reatividade de fármacos, proposição de novos catalisadores, reativação da AChE e desenvolvimento de processos de detoxificação química.⁶⁵⁻⁶⁹ Como exemplificado no Esquema 15, tem sido mostrado que as reações de substituição nos organofosfatos ocorrem tipicamente via ataque ao fósforo, com clivagem da ligação P-O, ou ao carbono, em que há quebra da ligação C-O. No caso das reações de hidrólise, de forma geral, o caminho preferencial ocorre pelo fósforo, porém em alquilfosfatos, a clivagem da ligação C-O incide como um caminho competitivo em pHs mais baixos, visto que, nesse caso, o grupo abandonador fosfato não apresenta carga (Esquema 15).⁴⁵ Uma das estratégias propostas para compreensão das rotas preferenciais em diferentes meios reacionais tem sido a utilização de água marcada com ¹⁸O, (Esquema 15), como no estudo da hidrólise alcalina do trimetilfosfato, onde foi mostrado que a reação ocorre exclusivamente via quebra da ligação fósforo-oxigênio, após realização de análise dos produtos obtidos.⁷⁰ Em contrapartida, ainda utilizando análises por substituição isotópica, foi

observado que a clivagem predominante no processo de hidrólise do dimetil fosfato em sua forma neutra ocorre via ligação carbono-oxigênio.⁷¹

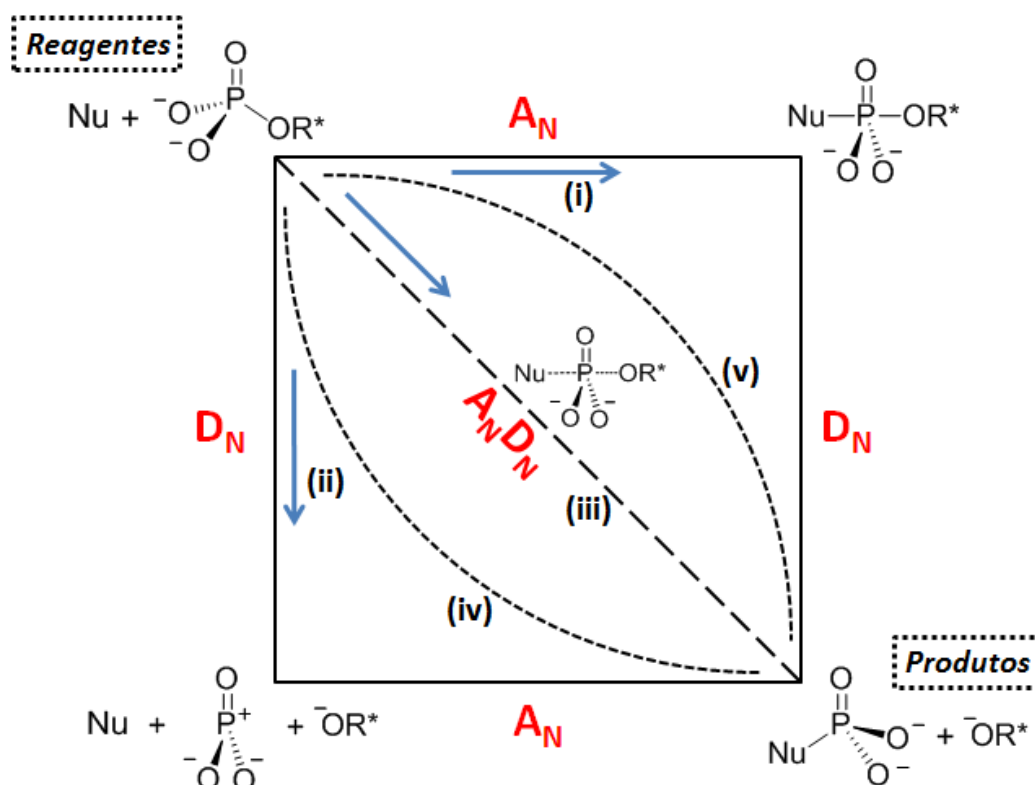
Esquema 15. Mecanismo de hidrólise de um monoéster de fosfato.



Os mecanismos gerais de quebra da ligação P-O são análogos aos de reações de substituição envolvendo carbono, e podem ser classificados em três tipos: (i) associativo, consistindo em uma etapa de adição e outra de eliminação ($A_D + D_N$), com formação de um intermediário pentacoordenado fosforano de geometria bipirâmide trigonal; (ii) dissociativo, também em duas etapas, porém com formação inicial de intermediário resultante de eliminação unimolecular com posterior formação de nova ligação com o fósforo ($D_N + A_D$) e (iii) concertado, consistindo em uma etapa única, com adição do nucleófilo e eliminação do grupo de saída simultaneamente ($A_D D_N$).⁴⁵ O diagrama de More O'Ferrall-Jencks, mostrado na Figura 2, ilustra de forma evidente os mecanismos gerais observados para reações de substituição via átomo de fósforo. Os mecanismos que apresentam duas etapas, (i, $A_D + D_N$) e (ii, $D_N + A_D$) são mostrados nas arestas do diagrama, e os intermediários de cada reação destacados nos vértices, imediatamente após os reagentes. Os mecanismos predominantemente concertados são representados no interior do diagrama, sendo que as linhas tracejadas curvas (iv e v) indicam caminhos com menor grau de sincronismo durante a formação e quebra das ligações na estrutura do ET. Isto é, sob certas condições, algumas reações podem apresentar variações dos caminhos mencionados, sendo intrinsicamente relacionadas ao nível de sincronismo da reação. Dentre estas, estão o caminho concertado de caráter associativo (v), com ET que apresenta maior grau de ligação

com o grupo de saída do que com o nucleófilo, e o caminho concertado de caráter dissociativo (iv), em que a quebra da ligação com o grupo de saída está mais adiantada que a formação da ligação com o nucleófilo.^{45,67}

Figura 2. Diagrama de More O'Ferrall-Jencks contendo os mecanismos de reações de substituição em ésteres de fosfato via átomo de fósforo.

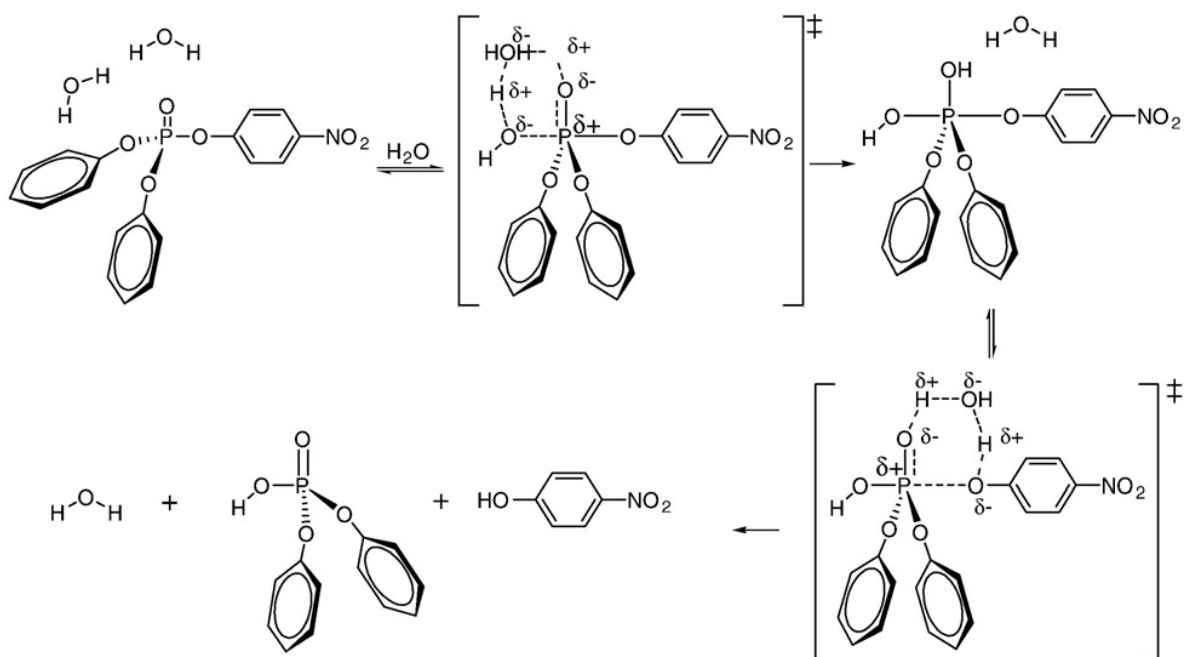


Dentre os diferentes tipos de ésteres de fosfato, a presença de grupo OH em mono e diésteres torna sua reatividade mais susceptível às mudanças de pH em comparação aos triésteres, devido a possibilidade de formação das espécies aniônicas resultantes da desprotonação. Especificamente com relação a reações de hidrólise, em contraste aos mono e diésteres de fosfato que tendem a apresentar mecanismo tipicamente concertado ($A_N D_N$, Figura 2),⁷² novas evidências tem sugerido que no caso dos triésteres, esse processo ocorre em duas etapas ($A_N + D_N$), como mostrado na sequência. No caso específico de monoésteres dianiônicos, forma majoritária em pH acima de 7, tem sido observado que a velocidade de clivagem tem pouca dependência com o pK_a do grupo abandonador, indicando fraca ligação desse com o fósforo e, portanto, compatível com mecanismo concertado,

porém de caráter dissociativo (caminho iv, Figura 2). Para a espécie monoaniônica de monoésteres, prevalente entre pH 2 e 7, entretanto, nota-se elevada sensibilidade à basicidade do grupo de saída, visto que esse pode ser estabilizado por uma transferência de próton intramolecular vinda do grupo OH. Já para diésteres alquílicos, predominantes na forma aniônica em soluções de pH acima de 2, estudos cinéticos tem mostrado que a velocidade de hidrólise tem maior dependência da basicidade do nucleófilo sendo, portanto, evidencia de que mecanismo concertado apresenta maior caráter associativo (caminho v, Figura 2).⁷³

Um dos estudos pioneiros referentes à hidrólise de triésteres de fosfato foi publicado no início da década de 70 por Kirby e Khan, tendo como foco a avaliação sistemática da reatividade da água e de uma série de outros nucleófilos.⁷⁴ Nesse trabalho, mostraram que a velocidade de clivagem de triésteres derivados do 1,3-propanodiol é sensível tanto à natureza do grupo abandonador, como do nucleófilo, sendo sugerido que, para a hidrólise, o mecanismo mais compatível é do tipo catálise básica-geral. Por meio de aplicação de cálculo mecânico-quânticos, essa hipótese foi recentemente confirmada, mostrando que a hidrólise de triésteres de fosfato em solução neutra ocorre em duas etapas, com formação de intermediário pentacoordenado, mesmo com a presença de bom grupo abandonador ($pK_a < 7$), como mostrado no Esquema 16.⁷³ O mecanismo detalhado da primeira etapa de reação envolve duas moléculas de água, sendo uma delas responsável pelo ataque nucleofílico, enquanto a outra auxilia o ataque transferindo próton à fosforila, resultando na formação do intermediário. A segunda etapa consiste na doação de um próton ao grupo de abandonador por uma terceira molécula de água, que abstrai simultaneamente o próton da fosforila e, finalmente, leva à clivagem do triéster. Para atribuir o correto caminho reacional, cálculos para um mecanismo concertado também foram realizados, resultando em energia de ativação muito superior à experimental. Além disso, sistemas variando o número de moléculas de água explícitas foram realizados, utilizando a energia livre de ativação experimental como parâmetro comparativo, sendo que o resultado com maior concordância resultante da inclusão de 3 moléculas de solvente participando da reação.

Esquema 16. Mecanismo de hidrólise do triéster difenil-2-nitro-fosfato.⁷³



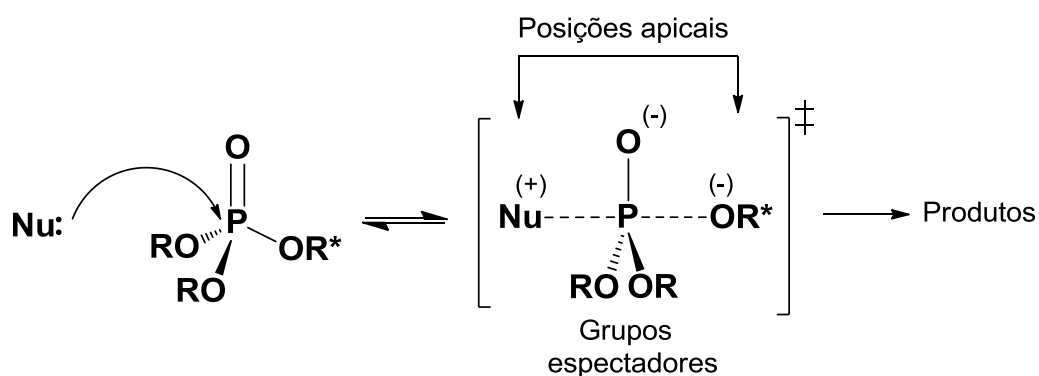
Fonte: Kirby, 2013

De forma geral, reações de substituição nucleofílica envolvendo triésteres tendem a ser mais rápidas comparadas com aquelas envolvendo mono e diésteres desprotonados. Uma das causas atribuídas a esse comportamento é a ausência de oxigênio aniônico nos triésteres, que leva a uma menor repulsão eletrostática entre o substrato e o nucleófilo.⁷² Além disso, em mono e diésteres contendo carga negativa, o orbital antiligante da ligação do fósforo com o grupo de saída (OR^*) se beneficia da conjugação com os elétrons não ligantes do O^- , resultando em interações hiperconjugativas do tipo $n_{O(-)}-\sigma^*_{P-OR^*}$, que diminuem o caráter positivo do fósforo, o que resulta também na diminuição da sua eletrofilicidade. Cabe ressaltar que esse tipo de interação também está presente nos triésteres, porém é mais fraca, do tipo $n_{OR}-\sigma^*_{P-OR^*}$, visto que grupos OR são piores doadores eletrônicos hiperconjugativos que O^- , tornando o fósforo de triésteres mais susceptível a ataques nucleofílicos.^{72,75}

Como mencionado, a velocidade de transferência do grupo fosforila em mono e diésteres em suas formas totalmente ionizadas tem maior influência da natureza do grupo abandonador e do nucleófilo, respectivamente. No caso dos triésteres, por sua vez, além de se mostrarem sensíveis a ambos (nucleófilo e grupo de saída),

apresentam alta influência de um terceiro fator: os grupos espectadores ou não-abandonadores.⁶⁵ Esses grupos permanecem em posições equatoriais na estrutura do ET, e apresentam menores comprimentos de ligação com o fósforo, enquanto o nucleófilo e o grupo abandonador ocupam posições apicais, como mostrado no Esquema 17. No estudo dos mecanismos nas reações envolvendo ésteres de fosfato, uma ferramenta bastante recorrente é a utilização de relações lineares de energia livre (RLEL), que mostra a dependência linear entre o logaritmo da constante de velocidade de certos processos em função de alguma propriedade ou parâmetro do sistema. Nesse contexto, por meio da RLEL relativa ao somatório dos pK_a s dos grupos espectadores, foi mostrado que nas reações de hidrólise de uma série de triésteres arílicos e alquílicos, de forma geral, uma maior basicidade dos grupos espectadores tende a aumentar a velocidade das reações.⁶⁵ Como as RLEL obtidas foram similares (inclinação) àquelas obtidas para o pK_a do nucleófilo ou grupo abandonador, foi sugerido que influência dos grupos espectadores na reatividade pode ser igualmente significativa. A principal razão associada a esse comportamento recai no maior efeito retirador eletrônico sofrido pelo fósforo, resultando em favorecimento do ataque nucleofílico.⁶⁵ Assim, reafirma-se a necessidade de compreensão mais detalhada de reações nucleofílicas envolvendo especificamente triésteres de fosfato, visto que além de comporem os pesticidas e armas químicas, também são mais susceptíveis à natureza do nucleófilo em comparação aos mono e diésteres.

Esquema 17. Posição dos grupos espectadores na estrutura do ET na transferência do grupo fosforila em um triéster de fosfato.



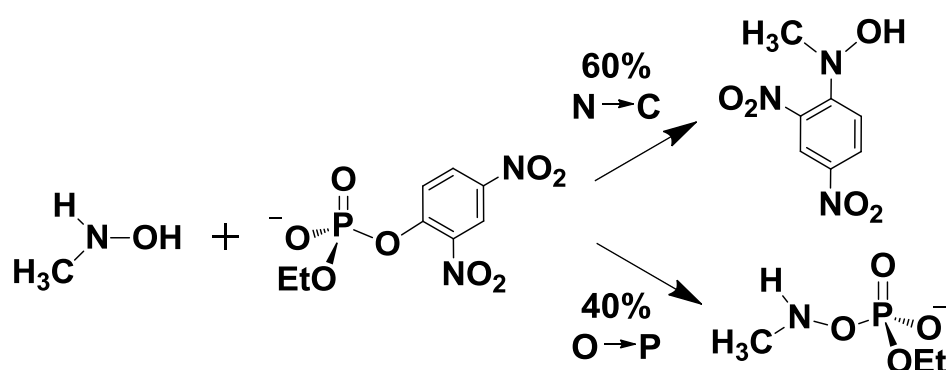
1.2.2. Reações nucleofílicas envolvendo ésteres de fosfato

O estudo detalhado de reações de transferência do grupo fosforila mediada por nucleófilos tem atraído interesse por permitir uma melhor compreensão dos mecanismos de ação enzimáticos. Além disso, a avaliação detalhada da reatividade de fármacos potencialmente nucleofílicos podem trazer informações importantes para pesquisas relacionadas aos seus efeitos colaterais e reações paralelas, tendo em vista a grande quantidade de estruturas com fósforo no organismo. Nucleófilos também são poderosos aliados para facilitar processos de detoxificação química, visto que rapidamente podem transformar organofosforados nocivos em outros de menor toxicidade ou, idealmente, em compostos mais susceptíveis a processos de solvólise, levando a formação de espécies não tóxicas. Nesse sentido, busca-se idealmente por catalisadores nucleofílicos que reajam com os organofosfatos e sejam facilmente regenerados ao término da reação.

Alguns nucleófilos detentores de efeito alfa tem apresentado alta reatividade com organofosfatos, causando incrementos que chegam à ordem de 10^8 vezes comparado com a reação com água.⁷⁶ Esses compostos são classificados como α -nucleófilos, uma classe de substâncias que apresenta reatividade superior a espécies de mesma basicidade. Essa peculiaridade é proporcionada pela existência de um ou mais pares de elétrons livre em átomo eletronegativo adjacente ao centro nucleofílico.⁷⁷ Exemplos desses nucleófilos incluem as oximas, peróxidos orgânicos, hidrazina, dentre outros. As razões atreladas a essa característica ainda não são plenamente claras, porém, tem-se sugerido possível estabilização do ET pela formação de estruturas mais rígidas, além de contribuições de transferência eletrônica, catalise intramolecular e polarizabilidade.⁷⁷ As reações de clivagem de dois triésteres de fosfato mediadas por uma série de oximas foram recentemente estudadas, sendo mostrado que dentre os α -nucleófilos avaliados, a 2-hidroxiimino-*N*-fenilacetamida levou a incrementos na ordem de 10^7 vezes comparado às respectivas hidrólises espontâneas dos organofosfatos.⁷⁸ Cabe ressaltar, entretanto, que nem sempre os nucleófilos se comportam de forma catalítica, ou seja, regenerando-se ao fim do processo reacional. Isso porque, dentre as possibilidades reacionais com o éster de fosfato, um ataque nucleofílico ao carbono pode levar à formação de produtos estáveis frente à solvólise. Esse comportamento é recorrente na literatura,^{79,80} sendo observado, por exemplo, na reação da hidroxilamina

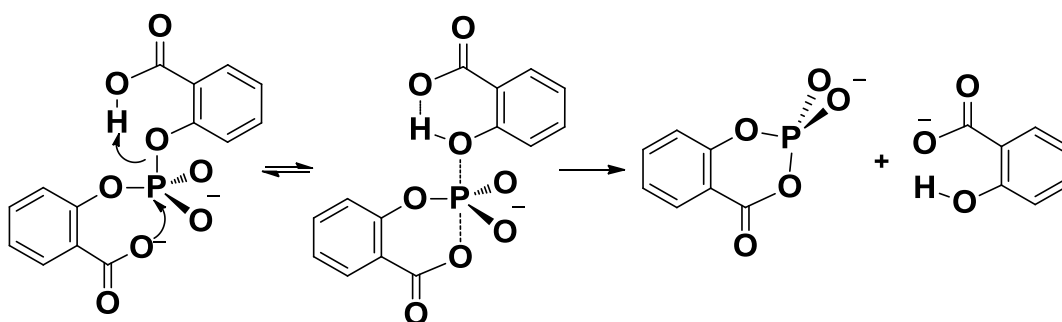
(NH_2OH) e seus derivados metilados H_3CNHOH , NH_2OCH_3 , $(\text{CH}_3)_2\text{NOH}$ com o diéster etil 2,4-dinitrofenil fosfato (EDNPP), como mostrado no Esquema 18.⁷⁹ Por meio de técnicas de RMN e cromatografia gasosa, foi mostrado que até 60% dos produtos (reação envolvendo o H_3CNHOH) foram formados por mecanismo de substituição nucleofílica aromática pelo nitrogênio, o que não leva à regeneração do catalisador. Nesse caso, tem-se uma transferência do grupo fosforila eficiente e rápida, o que é interessante, no entanto não há catálise.⁸¹

Esquema 18. Reações da *N*-metilhidroxilamina com EDNPP.⁸¹



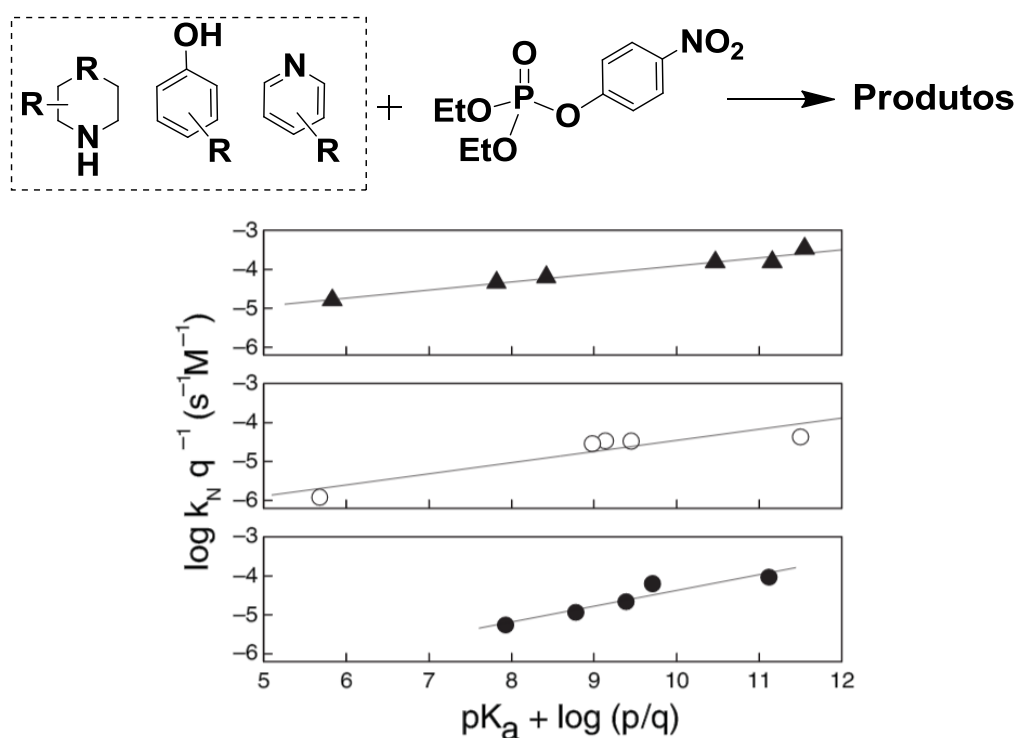
Um estudo clássico envolvendo catálise nucleofílica na clivagem de ésteres de fosfato foi publicado por Kirby *et al*, mostrando que a clivagem intramolecular do 2-carboxifenil fosfato ocorre 10^{10} vezes mais rapidamente comparada à reação em que o grupo carboxilato não está presente (Esquema 19).⁸² Foi observado que o mecanismo envolve a formação de intermediário cíclico e que a reação se processa via catálise nucleofílica proporcionada pelo carboxilato em orto. Nesse estudo, também foi mostrada a pequena contribuição da catálise ácida pela carboxila, auxiliando o grupo de saída.

Esquema 19. Clivagem catalítica intramolecular do 2-carboxifenil fosfato.



Em um trabalho recente, a substituição nucleofílica de um triéster de fosfato foi estudada com uma série de nucleófilos por meio de RLEL do tipo Bronsted, relacionando a constante de velocidade da reação com o pK_a do nucleófilo e do grupo abandonador.⁸³ Dentre os compostos avaliados nos estudos cinéticos, estavam aminas secundárias, piridinas e fenóis, como apresentado na Figura 3, com destaque para o 4-oxipiridina e 4-metoxifenol que se mostraram os mais reativos, com constantes de velocidade na ordem de $10^{-3} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ e incrementos catalíticos em torno de 10^4 vezes em relação à hidrólise espontânea do triéster. Como mostrado na Figura 3, perfis lineares foram obtidos para as três classes de substâncias no gráfico de Bronsted, com inclinações (β) de 0,21, 0,39 e 0,43 calculadas para os fenóis, aminas e piridinas, respectivamente. Devido à ausência de quebras no perfil e pelos valores de β , foi sugerido mecanismo concertado em todos os casos, com reações ocorrendo via ataque ao fósforo, visto que não houve sinais de reação pelo carbono aromático. Os autores não relatam investigação referente à etapa de solvólise dos intermediários e, portanto, não se pode afirmar se os processos são catalíticos.

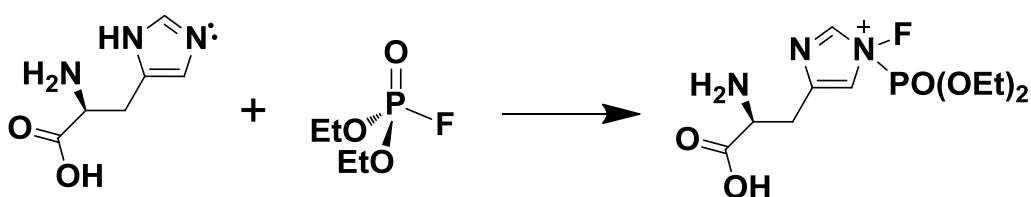
Figura 3. Estrutura geral dos nucleófilos avaliados em reação com o triéster 2,4-dinitrofenil fosfato e plots de Bronsted referentes a fenóis(\blacktriangle), piridinas (o), e aminas secundárias (\bullet).⁸³



Adaptado de: Castro, 2011.

Devido a sua fundamental importância no organismo, a histidina está no grupo dos derivados de IMZ de maior destaque, tendo motivado diversos trabalhos com o intuito de avaliar sua atividade catalítica fora do ambiente biológico. Um interessante estudo cinético foi publicado por Jauregg e Hackley, que investigaram a hidrólise do dietil flúor-fosfato catalisada por histidina e IMZ, como mostrado no Esquema 20, sendo proposto que o aumento na velocidade do processo está associado à formação de um intermediário cuja estrutura apresenta um nitrogênio quaternário.⁸⁴ Em contraste aos trabalhos de Bruice e Schmir citados anteriormente,¹⁹ nesse estudo foi mostrado que a histidina apresentou maior atividade catalítica que o IMZ, mesmo apresentando menor pK_{aH} (Tabela 2), porém sem menções à influência específica do substituinte.⁸⁴ Essas observações revelam que a tendência geral de que maiores valores de pK_{aH} levam a maiores nucleofilidades deve ser tratada com cautela no caso de derivados de IMZ. Isso porque, fatores como impedimento estérico, tipo de solvente, equilíbrio conformacional, formação de ligações de hidrogênio e outras interações atrativas, além da própria população das espécies do par tautomérico, podem ter influência fundamental na reatividade dessas espécies e sua compreensão detalhada requer maior atenção.

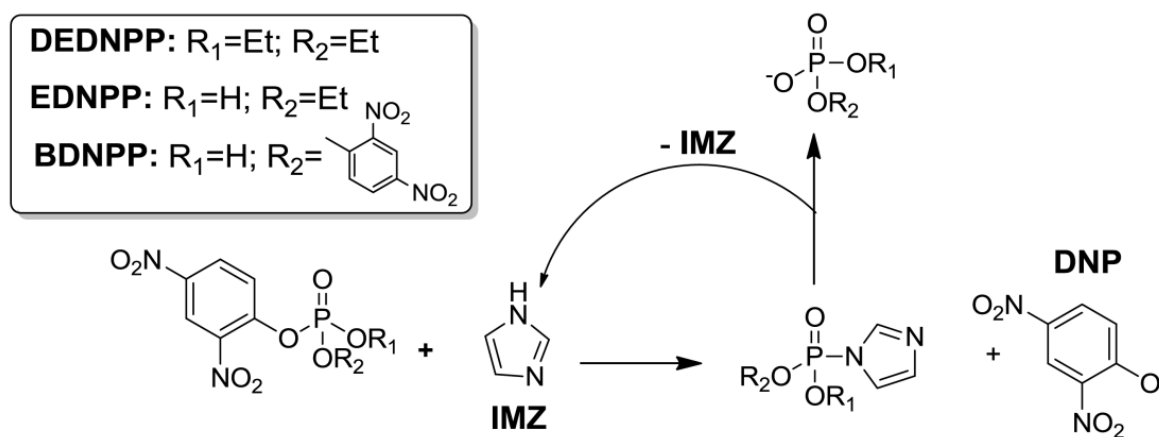
Esquema 20. Formação do intermediário na reação do dietil flúor-fosfato com histidina.



Atrelado ao seu papel fundamental em reações de desfosforilação nos sistemas biológicos, a atividade catalítica do IMZ tem sido explorada visando a clivagem de ésteres de fosfato, com foco na reatividade e compreensão mecânica dos processos. Nesse contexto, foi mostrada a alta atividade catalítica apresentada pelo IMZ em reações de clivagem intermolecular dos diésteres bis(2,4-dinitrofenil) fosfato (BDNPP), etil 2,4-dinitrofenil fosfato (EDNPP) e o triéster dietil 2,4-dinitrofenil fosfato (DEDNPP, Esquema 21).¹⁸ Na presença de IMZ, foram observados incrementos catalíticos na ordem de 2000, 3000 e 7500 vezes, em comparação à

hidrólise espontânea do BDNPP, EDNPP e DEDNPP, respectivamente. Os caminhos reacionais propostos pelos estudos cinéticos foram investigados por meio de análises de ressonância magnética nuclear (RMN) e espectrometria de massas (EM), sendo confirmado que o processo segue mecanismo compatível com catálise nucleofílica, visto que foram detectados intermediários fosforilados, que regeneravam o IMZ inicial. Espécies relativas a ataques ao carbono aromático ou alifático não foram observadas. Foi sugerido que a reação é compatível com mecanismo concertado, como mostrado no Esquema 21, consistindo inicialmente no ataque do nitrogênio tipo piridina do IMZ ao fósforo. Essa etapa leva à formação de intermediários que apresentam um curto tempo de meia-vida ($t_{1/2}$), devido à susceptibilidade frente a reação de hidrólise. Nesse caso, pode-se considerar o processo uma catálise autêntica, visto que o IMZ é regenerado ao fim do processo apenas pela atuação do meio reacional.

Esquema 21. Mecanismo de clivagem do DEDNPP, EDNPP e BDNPP com IMZ.¹⁸



Fonte: Orth, 2011

A busca por agentes nucleofílicos associada à investigação dos fatores que governam sua reatividade em sistemas simplificados de transferência do grupo fosforila são fundamentais para a compreensão dos complexos mecanismos enzimáticos. O aprimoramento de sistemas catalíticos que sejam eficientes em condições amenas também podem representar avanços em uma variedade de outros propósitos, como na proposição de antídotos substitutos das oximas na reativação da AChE e na projeção de sensores para controle de organofosforados em alimentos e no meio ambiente. Nesse contexto, pode-se enaltecer

especificamente o IMZ, visto que mesmo não detentor de efeito alfa, possui nucleofilicidade similar a α -nucleófilos, além de ter apresentado caráter catalítico autêntico em reações com organofosforados.¹⁸ Portanto, os derivados de IMZ aparecem como proeminentes catalisadores nucleofílicos e a avaliação detalhada do efeito de substituintes na sua reatividade pode trazer importantes avanços não apenas para processos de detoxificação química, mas também para o desenvolvimento de enzimas artificiais.

1.3. Cálculos teóricos aplicados às reações de transferência do grupo fosforila e reatividade do imidazol

Nas últimas décadas, cálculos teóricos têm sido amplamente utilizados em diversas áreas da química, com aplicações visando, por exemplo, atribuições espectroscópicas, análise conformacional, elucidação mecanística e até mesmo o desenvolvimento de catalisadores.⁸⁵ Entretanto, essa importância, eficácia e notoriedade são frutos de um longo processo de evolução científica, combinando principalmente os avanços computacionais, a física clássica (Newtoniana) e a gradativa compreensão dos princípios da mecânica quântica. Nesse sentido, cabe ressaltar que Martin Karplus, Michael Levitt e Arieh Warshel tiveram suas pesquisas sobre o desenvolvimento de modelos de cálculo para sistemas químicos complexos iniciadas mais de 40 anos antes de terem sido laureados com o Prêmio Nobel, em 2013.

Dentre os importantes alicerces referentes à origem da mecânica quântica moderna, está a determinação da Equação de Schrödinger, publicada em 1926. As soluções dessa equação são as chamadas funções de onda, que fornecem a descrição completa de um dado sistema microscópico, como átomos e moléculas, permitindo a obtenção de grandezas físicas de interesse, como energia, posição e momento, por meio da aplicação de operadores.^{86,87} Contudo, poucos sistemas permitem uma solução exata da Equação de Schrödinger (e.g. átomos hidrogenóides), tendo em vista a sua complexidade matemática.⁷⁵ Assim, um dos objetivos centrais da química computacional é ponderar tempo e acurácia, para que a modelagem de um certo sistema real seja feita de forma eficiente, e trabalhos direcionados ao aprimoramento de soluções aproximadas da Equação de

Schrödinger em sistemas multieletrônicos, tem sido fundamentais para vivificar esse propósito. Nesse contexto, pode-se enaltecer os trabalhos dos cientistas Walter Kohn e John Pople, que ganharam o Nobel de Química em 1998 pelas suas contribuições no tocante ao desenvolvimento da teoria funcional da densidade (DFT, do inglês Density Functional Theory) e de métodos computacionais em química quântica, sendo considerado por muitos o principal marco na consolidação da química computacional como um campo de estudo distinto.

Numa forma simplificada, a energia total do sistema, determinada pela DFT, leva em consideração quatro contribuições distintas, como mostrado na Equação 1,

$$E = E^T + E^V + E^J + E^{CT} \quad (1)$$

onde os três primeiros termos são correspondentes aos componentes da energia clássica, sendo E^T o termo da energia cinética eletrônica considerando a aproximação de Born-Oppenheimer, E^V representa a energia potencial de repulsão nuclear e atração núcleo-elétron e E^J relativo à repulsão eletrônica.⁸⁸ O termo E^{CT} , por sua vez, é composto por duas partes, sendo uma referente à interação de troca e outra da correlação elétron-elétron. Como ainda não é conhecido um funcional que relacione exatamente a densidade eletrônica à energia, se fez necessária a utilização de representações aproximadas para o termo E^{CT} . Por mais que existam diversos métodos para esse propósito, a natureza aproximada do termo da energia de correlação e troca pode acarretar na obtenção de resultados com erros consideráveis e, por isso, a escolha do funcional mais apropriado para um determinado sistema deve ser feito com cautela. Na química orgânica, dois dos funcionais mais recorrentes na literatura são o B3LYP^{89,90} e M06-2X⁹¹, tipicamente combinados com os conjuntos de base do Pople, para representação dos orbitais.⁹²

Enquanto nos métodos *ab initio* o sistema eletrônico é descrito por meio de sua função de onda, a DFT tem seu formalismo estabelecido nos teoremas de Hohenberg e Kohn, em que a densidade eletrônica do sistema aparece como variável importante.⁹³ Uma das vantagens desse tratamento recai no fato de que, enquanto a função de onda depende de $3N$ coordenadas espaciais (N = número de elétrons), o funcional (função de uma função) da densidade eletrônica considera o sistema como uma única partícula descrita por 3 variáveis, uma para cada

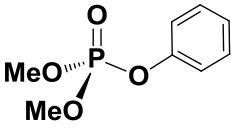
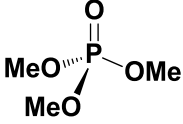
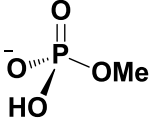
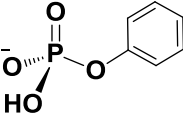
dimensão. Essa diferença em relação aos cálculos *ab initio* acarreta em redução considerável da complexidade do sistema.⁹³ Deste modo, cálculos que utilizam a DFT se destacam pelo baixo custo computacional, além de apresentarem boa acurácia nos resultados em comparação a dados experimentais.

Modelar reações de desfosforilação tem sido um contínuo desafio, principalmente envolvendo agentes nucleofílicos. Em estudos visando a elucidação mecanística, algumas informações são inacessíveis experimentalmente e, portanto, métodos de cálculo, sejam *ab initio* ou DFT, acabam por complementarem estudos cinéticos e colaboram para compreensão do caminho preferencial de uma reação. Especificamente no caso de ésteres de fosfato, investigações utilizando métodos teóricos aplicados às reações de hidrólise tem atraído maior atenção, como alguns exemplos mostrados em sessão anterior, porém, gradativamente, mais trabalhos nesse sentido têm sido publicados envolvendo reações com outros nucleófilos.

Arante e Chaimovich avaliaram o tipo de mecanismo predominante e a influência do nucleófilo em processos de tiólise e alcoólise via clivagem da ligação P-O em uma série de triésteres e monoésteres.⁹⁴ Nesse estudo, utilizaram método MP2 combinado com uma série de funções de base, dentre elas 6-31+G(d) e 6-311+G(2df,2p). Mostraram que a tiólise em triésteres é mais lenta em comparação à alcoólise e observaram que ambas as reações ocorrem em duas etapas seguindo preferencialmente mecanismo do tipo $A_N + D_N$, com formação de intermediário pentacoordenado, como mostrado na Tabela 3. A velocidade das reações envolvendo triésteres também se mostrou altamente dependente da natureza do nucleófilo e grupo abandonador, visto que a tiólise apresentou barreira 35 kcal mol^{-1} mais alta que a alcoólise e a dissociação do trimetilfosfato requereu 36 kcal mol^{-1} a mais que no caso do dimetilfenilfosfato. Isso porque, o metóxido apresenta maior basicidade que o fenóxido e, portanto, é pior grupo de saída, desfavorecendo a reação. No processo de tiólise dos monoésteres, o mecanismo predominante se mostrou dependente da natureza do grupo abandonador, visto que para o metilfosfato foi observado mecanismo dissociativo ($D_N + A_N$) enquanto para o fenilfosfato foi predominantemente associativo ($A_N + D_N$, Tabela 3). Barreiras energéticas similares entre os mecanismos associativo e dissociativo foram observadas para a reação de alcoólise do fenilfosfato, enquanto caminho preferencialmente dissociativo foi observado para o metilfosfato, sugerindo que esse

processo também é sensível a natureza do grupo de saída. Cabe ressaltar que em trabalho anterior, os autores haviam mostrado que no processo de tiólise do triéster trimetílico a rota preferencial ocorre via clivagem da ligação C-O, em detrimento à quebra da ligação P-O, por meio de mecanismo concertado.⁹⁵ Mesmo assim, os resultados obtidos nos estudos mecanísticos via fósforo foram relevantes no sentido de compreender a ação das proteínas tirosina fosfatases, uma família de enzimas que catalisa reações de desfosforilação de resíduos de tirosina de outras proteínas do organismo, promovida por meio do ataque nucleofílico da cisteína.⁹⁶

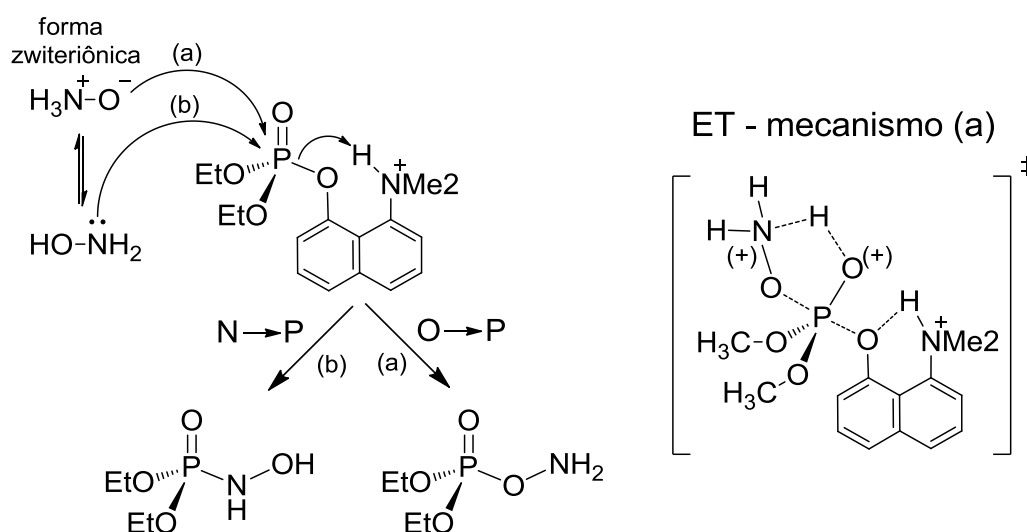
Tabela 3. Mecanismos de alcoólise e tiólise via fósforo em uma série de organofosfatos.

Éster	Estrutura	Alcoólise	Tiólise
Dimetilfenilfosfato		$A_N + D_N$	$A_N + D_N$
Trimetilfosfato		$A_N + D_N$	$A_N + D_N$
Metilfosfato		$D_N + A_N$	$D_N + A_N$
Fenilfosfato		$A_N + D_N$ e $D_N + A_N$	$A_N + D_N$

Como mencionado anteriormente, estudos tem mostrado a alta reatividade do α -nucleófilo ambidentado hidroxilamina promovendo reações com organofosforados via ataques pelo oxigênio ou nitrogênio.⁹⁷⁻⁹⁹ Nesse sentido, tem sido observado que sua forma zwitteriônica ($^+NH_3O^-$) é a mais reativa em processos de desfosforilação, tipicamente com preferência de ataque via oxigênio aniônico ao fósforo (mecanismo (a), Esquema 22). Esse comportamento foi detalhado, por exemplo, no estudo da reação da hidroxilamina com o dietil-8-dimetilamônio-1-naftol, em que não foram detectados produtos referentes às outras possíveis rotas, como ataques nucleofílicos pelo nitrogênio ou oxigênio ao carbono do triéster ou via nitrogênio ao fósforo.⁹⁷ Cálculos realizados em nível Hartree-Fock com conjunto de base 6-

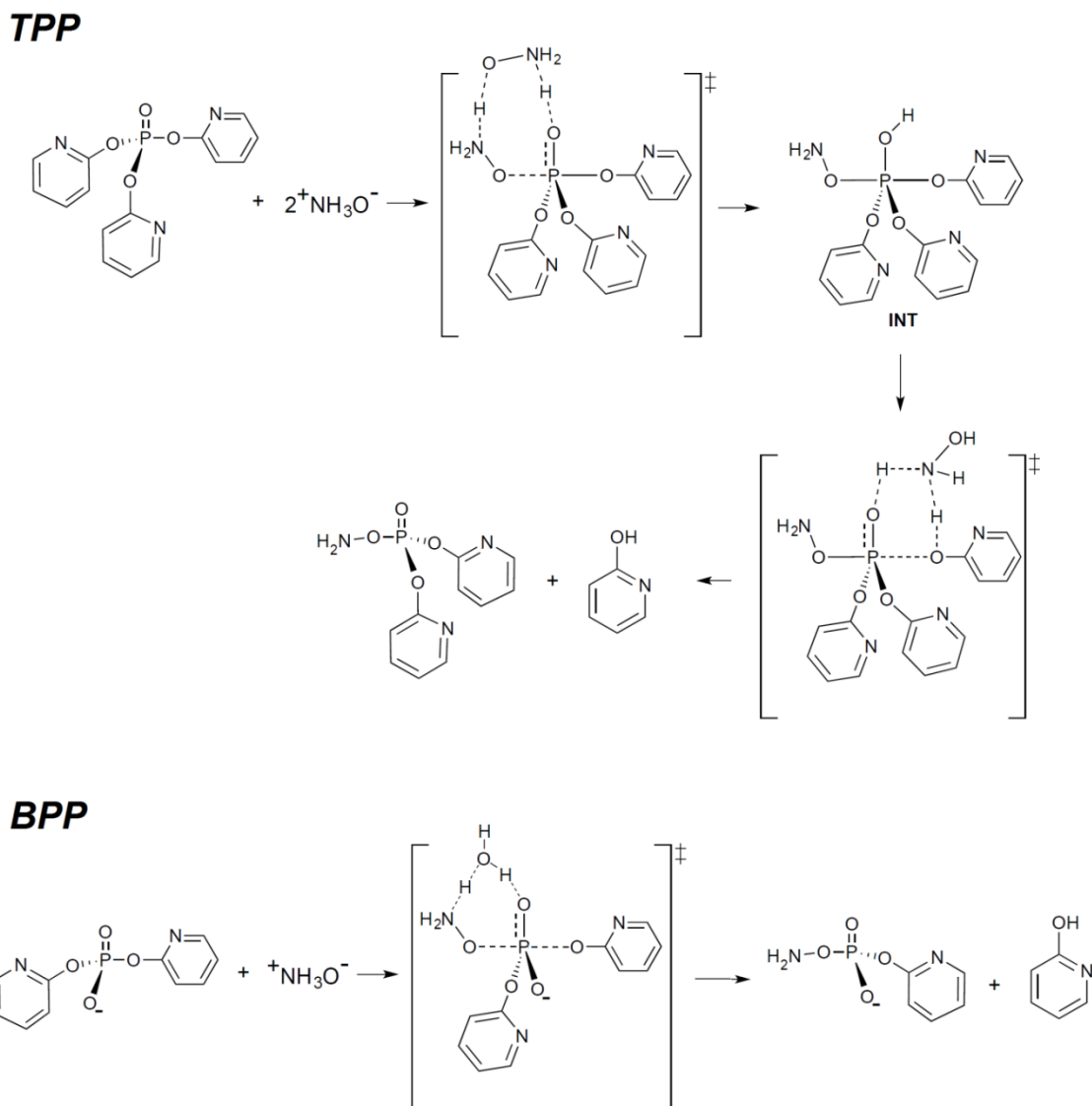
31G(d,p) permitiram não apenas confirmar a rota reacional de ataque do oxigênio ao fósforo (Esquema 22, a), mas também revelar que o mecanismo é do tipo catálise ácida-geral intramolecular, com transferência de próton do grupo $^+\text{NH}_3$ ao oxigênio da fosforila, facilitada pela formação de uma ligação de hidrogênio $\text{NH}\cdots\text{O}$ na estrutura do ET.

Esquema 22. Mecanismos de reação da hidroxilamina com um triéster de fosfato e ET do caminho (a).⁹⁷



Em trabalho posterior, cálculos utilizando o método B3LYP/6-31++g(d,p) permitiram avaliar as diferenças mecanísticas entre as reações da hidroxilamina com um di e um triéster de fosfato.¹⁰⁰ Foi mostrado que o triéster tris-2-piridil fosfato (TPP) sofre reação de adição-eliminação em duas etapas, com formação de intermediário pentacoordenado (Esquema 23). Nesse processo, a barreira de ativação mais próxima do valor experimental foi obtida com a inclusão de duas moléculas explícitas de hidroxilamina, uma delas atuando como nucleófilo e outra auxiliando a transferência do próton para formação do intermediário. No caso da reação envolvendo o diéster monoaniônico bis-2-piridil fosfato (BPP) foi observado um mecanismo concertado, em que o ataque nucleofílico do oxigênio da hidroxilamina é beneficiado por uma ligação de hidrogênio entre seu grupo $^+\text{NH}_3$ e uma molécula de água. Nesse caso, não foi observada a transferência do próton, porém, mesmo assim, essa interação levou à estabilização do ET (Esquema 23).¹⁰⁰

Esquema 23. Mecanismos de clivagem do triéster TPP e do diéster BPP mediado por hidroxilamina.¹⁰⁰

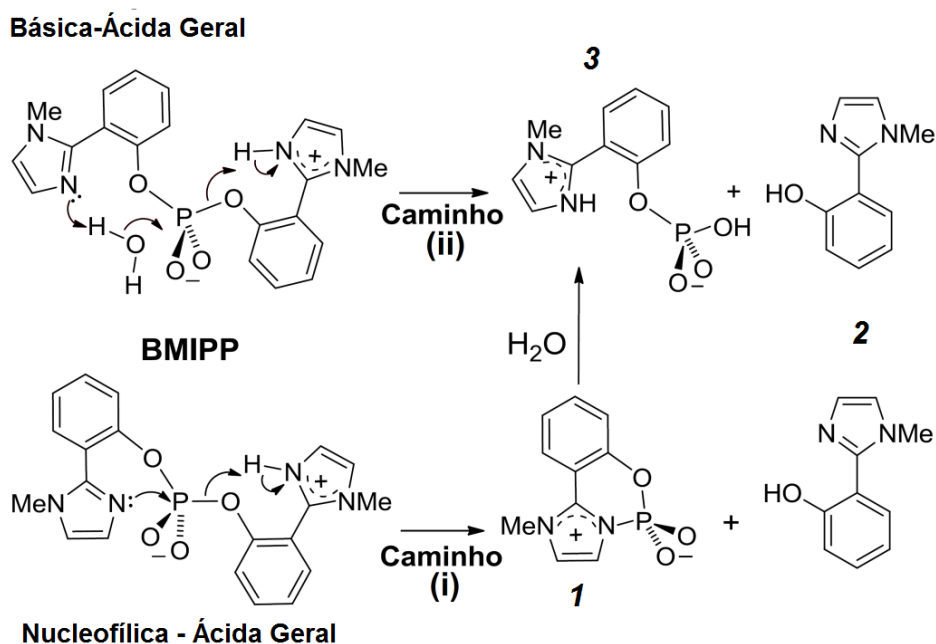


Fonte: Medeiros, 2013.

Grande atenção tem sido direcionada ao estudo e desenvolvimento de catalisadores bifuncionais, que tipicamente apresentam efeito cooperativo de dois grupos próximos, tornando possível a ocorrência de mecanismos mais favoráveis que aqueles de um único grupo funcional. Nesse sentido, destaca-se a alta velocidade de hidrólise apresentada pelo diéster bis(2-(1-metil-1H-imidazol-3-íno-2-il)fenil) fosfato (BMIPP) em relação a outros ésteres com grupo abandonador de pK_a semelhante, que foi detalhadamente abordada por um amplo conjunto de técnicas

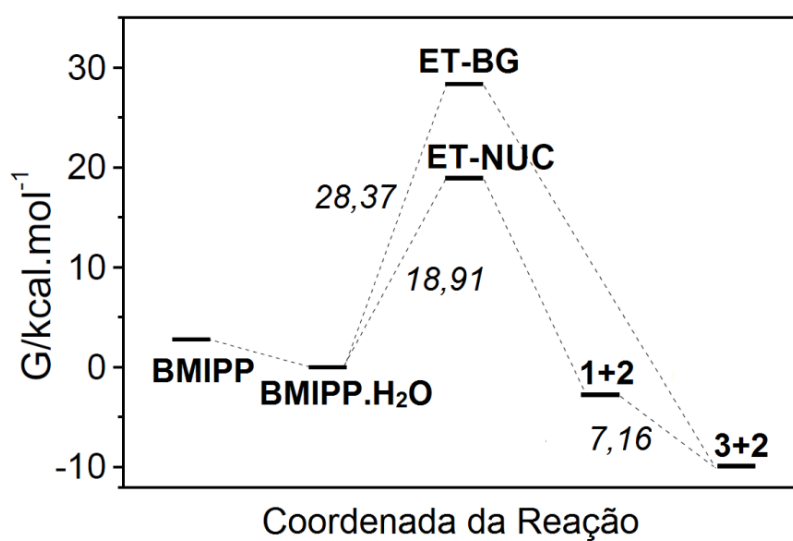
experimentais visando a caracterização de intermediários e produtos de reação.¹⁰¹ Esse processo catalítico intramolecular bifuncional representa um interessante modelo para compreensão da atuação da enzima fosfolipase D, que atua na clivagem de diésteres de fosfato em meio biológico por meio de dois grupos IMZ.⁷ Os resultados cinéticos obtidos foram compatíveis com dois mecanismos equivalentes, sendo um via catálise nucleofílica e outro via catálise básica geral, e apenas com a aplicação de métodos de cálculo foi possível a distinção das rotas reacionais e proposição do caminho preferencial. Na primeira proposta (i), a clivagem do diéster teria um dos grupos IMZ atuando como catalisador nucleofílico, enquanto o outro IMZ, na forma de imidazolil, assistiria o grupo de saída via catálise ácida geral de forma concertada, levando a formação de um intermediário, como mostrado no Esquema 24. Na outra proposta (ii) um IMZ estaria atuando como catalisador básico, auxiliando o ataque nucleofílico da água, enquanto o outro grupo IMZ, tal qual a primeira proposta, atuaria como catalisador ácido. Esse mecanismo, em primeiro momento, seria o preferencial por não envolver a formação de um intermediário de reação aparentemente instável (Estrutura 2, Esquema 24). Assim, cálculos em nível B3LYP combinados com as funções de base 6-31+G(d) para átomos de fósforo, nitrogênio e oxigênio, 6-31G(d) e 6-31G para carbono e hidrogênio, respectivamente, foram realizados para propor o mecanismo mais favorável. Contrariando a expectativa inicial, o diagrama de energia ao longo da coordenada da reação indicou o favorecimento do mecanismo catalítico bifuncional, com o IMZ atuando como nucleófilo na etapa inicial (caminho (i), Esquema 24), como mostrado na Figura 4. Esse mecanismo apresentou barreira reacional quase 10 kcal mol⁻¹ mais baixa do que a segunda proposta, na qual o mecanismo envolveria a catálise básica geral, (caminho (ii), Esquema 24).¹⁰² Nesse trabalho, a aplicação de métodos de cálculo foi fundamental para a proposição do mecanismo preferencial, inicialmente ambíguo, confirmando a importância da combinação dessa ferramenta com metodologias experimentais. Posteriormente, por meio de utilização de um espectrofotômetro de massas de alta resolução, foi possível detectar o intermediário 1 (Esquema 24), confirmando o mecanismo nucleofílico sugerido pelos cálculos teóricos.

Esquema 24. Mecanismos propostos de clivagem do diéster BMIPP.



Fonte: Orth, 2011.

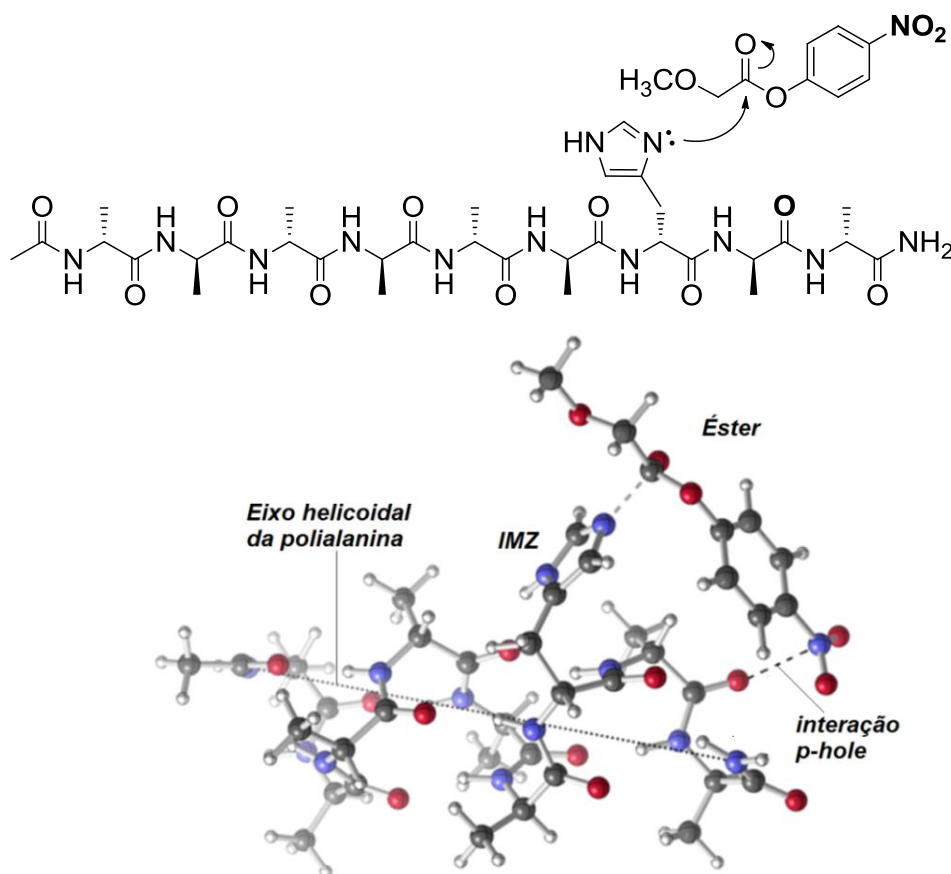
Figura 4. Diagrama de energia para os mecanismos de clivagem do diéster BMIPP propostos de acordo com Esquema 24, sendo ET-BG e ET-NUC os ET obtidos para as catálises básica-geral e nucleofílica, respectivamente.



Fonte: Orth, 2011.

O mecanismo envolvendo a catálise nucleofílica proporcionada pelo anel de IMZ também se mostrou o caminho preferencial no estudo da reação da transferência do grupo acila do 4-nitrofenil-2-metoxiacetato, mediada por histidina, ancorada em uma cadeia de polialanina (Figura 5). Procurando avaliar quais fatores governam a velocidade da reação, Tantillo e colaboradores realizaram cálculos utilizando os funcionais M06-2X e ω B97XD combinados com as funções de base 6-31G(d) e 6-311+G(2d,p) e observaram que a maior influência no abaixamento das barreiras reacionais resulta da formação de interações atrativas locais, em detrimento ao macrodipolo da hélice. Dentre fatores construtivos na estrutura molecular, apresentaram alta magnitude as interações entre (i) o par de elétrons não ligante da carbonila da polialanina com o grupo nitro do grupo de saída do éster (interação chamada π -hole) e (ii) o hidrogênio da posição 2 do anel de IMZ com a carbonila do éster (Figura 5).¹⁰³

Figura 5. Reação da histidina em polialanina com um éster. O ET calculado mostra importantes interações construtivas na estrutura molecular.¹⁰³



Adaptado de: Nguyen, 2015.

Assim, com o intuito de se obter maiores detalhes acerca da reatividade e elucidação mecanística envolvendo ésteres de fosfato, cálculos teóricos tem se mostrado uma ferramenta fundamental, esclarecendo detalhes não alcançáveis apenas com a utilização de experimentação. Pode-se citar, por exemplo, a hidrólise de ésteres de fosfato, que tem sido estudada há mais de cinco décadas¹⁰⁴ e apenas recentemente, pela realização de cálculos com metodologias mecânico-quânticas, tem sido possível compreender detalhadamente a estequiometria e as etapas envolvidas no processo. Como referido no caso de triésteres de fosfato, em que foi revelado que o processo ocorre em duas etapas com o envolvimento de três moléculas de água auxiliando o ataque nucleofílico, estabilizando o intermediário pentacoordenado e o grupo de saída (Esquema 16).⁷² Cabe mencionar também a importância dos resultados obtidos por meio de aplicação de métodos de cálculo no detalhamento do efeito do grupo espectador na hidrólise de triésteres (Esquema 17), corroborando as observações obtidas experimentalmente por meio de RLEL.⁶⁶ Portanto, a associação metódica de técnicas experimentais e teóricas permitem, em conjunto, superar as limitações encontradas em cada metodologia e possibilitam maior plenitude na compreensão das reações químicas.

2. OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS

2.1. Objetivo geral

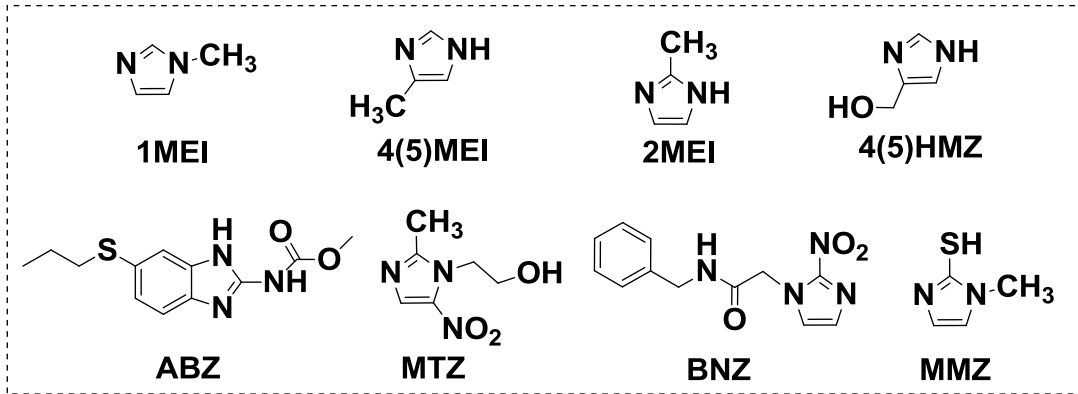
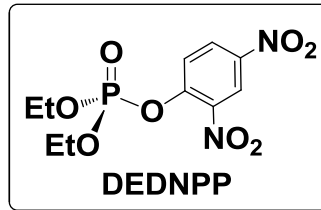
O objetivo desse trabalho foi estudar a reatividade de derivados de IMZ nas reações de desfosforilação do triéster DEDNPP, analisando o efeito de substituinte e solvente, com intuito de elucidar os mecanismos reacionais através de estudos cinéticos e computacionais.

2.2. Objetivos específicos

Para alcançar o objetivo geral foi utilizado o seguinte conjunto de estratégias:

- Realizar estudos cinéticos para avaliar o potencial catalítico dos fármacos albendazol (ABZ, carbamato de metil *N*-(5-propilsulfanil-3H-benzoimidazol-2-il); metronidazol (MTZ, 1-(β -hidroxi-etil)-2-metil-5-nitroimidazol); metimazol (MMZ, 2-mercapto-1-metilimidazol) e benznidazol (BNZ, *N*-benzil-2-nitroimidazol-acetamida) na clivagem do triéster DEDNPP. As estruturas estão mostradas no Esquema 25.
- Investigar por estudos cinéticos a influência da posição do grupo metila no anel de IMZ nas reações do DEDNPP com 1MEI, 2MEI e 4(5)MEI.
- Avaliar qualitativa e quantitativamente por estudos cinéticos o efeito da composição de mistura binária dos solventes sulfóxido de dimetila (DMSO) e água nas reações de desfosforilação do IMZ e 1MEI com DEDNPP.
- Averiguar a influência do substituinte na reatividade do derivado 4(5)-hidroximetilimidazol (4(5)HMZ) frente à desfosforilação do DEDNPP.
- Realizar análises por EM e RMN para detectar intermediários e produtos reacionais das reações avaliadas, com intuito de elucidar o mecanismo.
- Realizar cálculos teóricos das reações avaliadas experimentalmente, a fim de corroborar o mecanismo e elucidar a reatividade.
- Propor novos catalisadores baseados em IMZ para reações de desfosforilação mediante troca ou inclusão de substituintes através de cálculos teóricos.

Esquema 25. Estruturas das espécies envolvidas nesse trabalho.



3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Reagentes

O triéster DEDNPP foi sintetizado no Grupo de Catálise e Cinética (GCC) da UFPR, conforme método descrito na literatura.¹⁰⁵ ABZ foi obtido em uma farmácia de manipulação com pureza 99%. Os derivados de imidazol 1MEI, 2MEI, 4(5)MEI, HMZ, MMZ, MTZ e BNZ, os surfactantes brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) e dodecilsulfato de sódio (SDS), o ácido trifluoroacético deuterado e os solventes foram obtidos comercialmente (Sigma-Aldrich) com pureza igual ou superior a 97%. D₂O foi adquirido na *Cambridge Isotope Laboratories*.

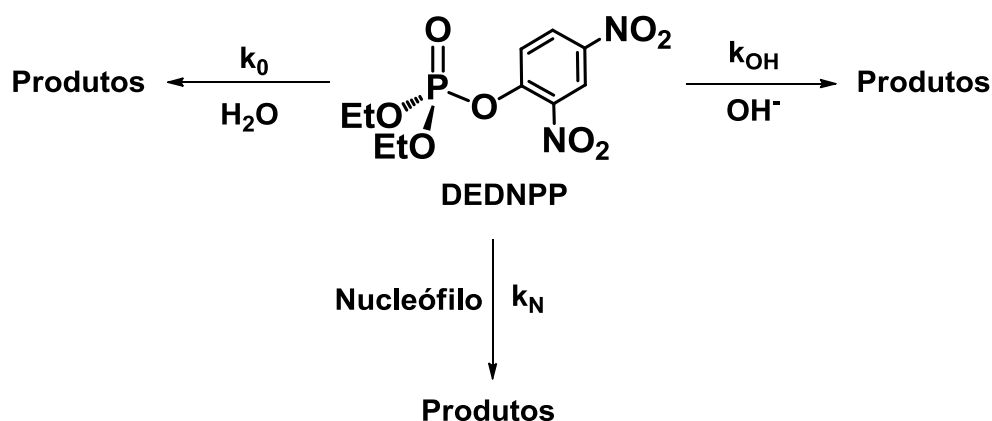
3.2. Estudos cinéticos

Os estudos cinéticos foram realizados nos espectrofotômetros UV-Vis Shimadzu modelos UV2401 e UV2450 disponíveis respectivamente no Laboratório Multiusuários e no Laboratório do Prof. Dr. Aldo Zarbin, ambos no Departamento de Química da UFPR. No estudo cinético foram avaliados os fatores: (i) validade das condições de pseudo-primeira ordem; (ii) pH; (iii) concentração do nucleófilo; (iv) efeito isotópico; (v) temperatura e (vi) solvente. As reações foram iniciadas com a adição de uma alíquota (10 μL) de uma solução estoque do triéster ($7,5 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ em CH₃CN mantida a -4 °C) em 3 mL de solução do derivado de IMZ contida na cubeta de quartzo. O controle da temperatura durante as reações foi realizado com a utilização de banho termostatizado. O pH do meio reacional no estudo cinético foi fixado com uso de tampões (0,01 mol L⁻¹) de acordo com a faixa desejada, sendo os principais: ácido acético (pH 4-5,5); diidrogenofosfato de sódio (pH 5,5-7,8); bicarbonato de sódio (pH 8-9,5); bis-tris (pH 9-10,5). Os derivados de IMZ mostraram-se tamponantes na faixa de mais ou menos duas unidades de pH na região de seu pK_{aH}, portanto nem sempre foi necessária utilização de tampão.

O estudo cinético das reações foi realizado tipicamente por meio do monitoramento das bandas em 360 ou 400 nm, relativas ao aparecimento do produto 2,4-dinitrofenolato (DNP), como mostrado na Figura 6A. A reatividade de um determinado nucleófilo foi avaliada pelas constantes de velocidade (k_{obs}) obtidas

$$\frac{d[DEDNPP]}{dt} = -k_0[DEDNPP] - k_{OH}[^-OH][DEDNPP] - k_N[N][DEDNPP] \quad (2)$$

Esquema 26. Reações paralelas do DEDNPP em meio aquoso na presença de um nucleófilo.



A Equação 2 pode ser reescrita na forma:

$$\frac{d[DEDNPP]}{dt} = -[DEDNPP](k_0 + k_{OH}[^-OH] + k_N[N]) \quad (3)$$

Como em condições de pseudo-primeira ordem a concentração dos nucleófilos é praticamente constante durante a reação, pode-se considerar que:

$$k_{obs} = k_0 + k_{OH}[^-OH] + k_N[N] \quad (4)$$

E, portanto:

$$\frac{d[DEDNPP]}{dt} = -k_{obs}[DEDNPP]_t \quad (5)$$

onde t é o tempo representado em segundos ou minutos, $[DEDNPP]_t$ é a concentração do triéster em mol L^{-1} no tempo t e k_{obs} é a constante de velocidade observada de primeira ordem (s^{-1}). Integrando a lei de velocidade mostrada na Equação 5, considerando os limites de integração do tempo inicial ($t=0$) até tempo t , obtém-se:

$$[DEDNPP] = [DEDNPP]_0 e^{-k_{obs}t} \quad (6)$$

Que corresponde à lei de velocidade integrada de primeira ordem referente ao consumo do reagente DEDNPP, sendo a concentração inicial do triéster em mol L⁻¹ e representada por [DEDNPP]₀. Considerando que a concentração de DEDNPP em tempo t é correspondente à diferença entre as concentrações do DNP no final da reação ([DNP]_∞) e no tempo t :

$$[DEDNPP]_t = [DNP]_{\infty} - [DNP]_t \quad (7)$$

e que a concentração inicial de DEDNPP é igual à concentração de DNP ao fim da reação:

$$[DEDNPP]_0 = [DNP]_{\infty} \quad (8)$$

Pode-se obter a lei de velocidade integrada de pseudo-primeira ordem em função do produto combinando as equações 6, 7 e 8 :

$$[DNP] = [DNP]_0(1 - e^{-k_{obs}t}) \quad (9)$$

A lei de velocidade em função da absorvância (A) da espécie de interesse pode ser obtida por meio da lei de Beer-Lambert (Equação 10), que a relaciona com a concentração (C) da espécie (no caso o DNP) em mol L⁻¹, por meio de sua absorvância molar (ϵ) e do caminho ótico da amostra (l , em cm):

$$A = \epsilon l C \quad (10)$$

Assim, combinando as Equações 9 e 10 chega-se em:

$$A_t = A_0 + (A_{\infty} - A_0)(1 - e^{-k_{obs}t}) \quad (11)$$

Em que A_t , A_0 e A_{∞} referem-se às absorvâncias da espécie no tempo t , inicial e infinito, respectivamente. Para o cálculo de k_{obs} , a equação 11 pode ser utilizada diretamente a partir dos dados experimentais adquiridos espectrofotometricamente.

As reações foram monitoradas por no mínimo quatro tempos de meia-vida e os valores de k_{obs} calculados pelo ajuste iterativo dos perfis de absorvância vs tempo (Figura 6B). Para os dados experimentais que não apresentaram curvas cinéticas compatíveis com perfil de primeira ordem, outras equações foram propostas para cada caso, *vide infra*. Consideraram-se satisfatórios os ajustes com coeficientes de correlação (r^2) superiores a 0,99. Todas as regressões lineares e não-lineares foram realizadas com o programa *Origin 8.5* utilizando o algoritmo de *Levenberg-Marquardt* para encontrar o mínimo da soma dos quadrados.

3.3. Espectrometria de massas

Para detecção de intermediários de reação utilizou-se a técnica de EM (LQTMS). As análises foram realizadas em um espectrômetro de captura de íons (LQT-XL) equipado com fonte de ionização por *electrospray* (ESI) disponível no Departamento de Química na UFPR. Foram realizadas medidas em intervalos de tempo estratégicos a fim de se confirmar os mecanismos propostos e investigar possíveis intermediários. O aparelho foi operado no modo do íon negativo e positivo e espécies mais importantes foram submetidas à dissociação por colisão induzida (ESI-MS/MS, CID) com hélio com faixa de energia de colisão entre 5 e 35 eV. As análises foram realizadas com a colaboração do Prof. Alfredo R. M. de Oliveira.

3.4. Ressonância Magnética Nuclear

Análises por RMN foram executadas para fins de caracterização quantitativa e monitoramento das espécies envolvidas nas reações. Os experimentos foram realizados nos espectrômetros Bruker Avance III de 400 e 600 MHz. As amostras dos derivados de IMZ foram preparadas em solução aquosa contendo 0,2 mL de D_2O com pH fixado pelo próprio nucleófilo. As reações eram iniciadas imediatamente antes da análise pela adição de alíquota de solução de DEDNPP (em acetonitrila) ao tubo contendo o nucleófilo e espectros sucessivos de 1H e ^{31}P , a 298 K, foram adquiridos ao longo do progresso da reação. Utilizou-se ácido 3-(trimetilsilil)propionico- D_4 (TMSP) presente no D_2O como padrão na aquisição dos espectros de 1H e ^{13}C enquanto para técnica de RMN de ^{31}P os deslocamentos

químicos das espécies eram relacionados com H_3PO_4 . A correta atribuição dos sinais presentes nos espectros de RMN de ^1H foi confirmada com auxílio de experimentos bidimensionais de correlação direta HSQC (^1H - ^{13}C) e a longa distância HMBC (^1H - ^{13}C e ^1H - ^{31}P). Todas as análises foram realizadas com a colaboração do Leociley R. A. Menezes e do Prof. Anderson Barison.

3.5. Cálculos teóricos

Os estudos teóricos foram realizados no Laboratório Central de Processamento de Alto Desempenho (LCPAD) da UFPR, nos computadores do Laboratório de Química Teórica da UTFPR e principalmente no *cluster* do Prof. Dean J. Tantillo da Universidade da Califórnia – Davis, nos Estados Unidos durante o estágio de doutorado sanduiche. Realizaram-se cálculos mecânico-quânticos aplicando a DFT, utilizando principalmente os híbridos B3LYP^{89,90} e M06-2X.⁹¹ As funções de base do Pople com adição de funções de polarização e difusas foram escolhidas para a maioria dos cálculos, sendo a 6-31+G(d,p) mais comumente utilizada. A escolha dos métodos mais representativos do sistema foi realizada com base na comparação dos resultados teóricos e experimentais, sendo todos os cálculos realizados com o pacote mais recente do Gaussian.¹⁰⁶

Para simulação da solvatação foi utilizado o conjunto *polarizable continuum model* (PCM)¹⁰⁷ em associação ao *solvation model density* (SMD),¹⁰⁸ no qual o solvente é considerado de forma implícita e com base na sua permissividade, gerando uma cavidade molecular em torno do soluto. Esse método é específico para redução de custo computacional em comparação à simulação realizada com moléculas explícitas de solvente. A inclusão de solvatação implícita foi realizada em todos os cálculos.

Para obtenção de geometrias de partida adequadas aos cálculos de otimização de geometrias, buscas conformacionais sistemáticas foram realizadas por meio de mecânica molecular, utilizando o *software Spartan*.¹⁰⁹ Posteriormente, cálculos quânticos para determinação das energias de cada estrutura foram realizados. Finalmente, para aqueles confôrmeros dentro do limite de energia relativa de até 3 kcal mol^{-1} , cálculos de otimização de geometria foram executados, sendo descartadas as estruturas de energia superior, visto que representam

percentual insignificante no equilíbrio conformacional. A população de cada confômero foi determinada por meio da função de partição considerando a distribuição de Boltzmann relativa à energia livre de Gibbs, obtida a partir do cálculo termoquímico padrão do Gaussian. Além da energia livre de Gibbs, a partir desse cálculo também é possível obter as outras propriedades termodinâmicas como a correção de energia de ponto zero, entalpia e entropia.

As estruturas dos ET de cada reação foram propostas com base nos parâmetros termodinâmicos e outras evidências experimentais. Para a obtenção das dos TS, foram realizadas basicamente duas aproximações: (i) *scans* ao longo do rompimento e formação das ligações químicas envolvidas na reação, com posterior otimização da estrutura obtida de mais alta energia e (ii) o método *transit-guided quasi-Newton* (TGQN) com o qual a estrutura do ET é estimada com base nas estruturas dos produtos e reagentes.¹¹⁰ As estruturas otimizadas dos ET foram identificadas pela presença de uma única frequência imaginária obtida pelo cálculo termoquímico a 298 K e 1atm, enquanto nenhuma foi observada para as estruturas dos mínimos referentes a reagentes, produtos e intermediários.

A partir das geometrias otimizadas dos ET de primeira ordem, cálculos da coordenada intrínseca da reação (IRC) foram realizados para compreensão detalhada da dependência da energia do sistema.¹¹¹ Para a obtenção dos perfis, foram realizados cálculos no sentido dos reagentes e dos produtos, mostrando detalhadamente em cada ponto do progresso da reação, desde a aproximação dos reagentes, formação do ET, até os produtos. As barreiras reacionais foram calculadas considerando os reagentes infinitamente separados, sendo considerada para cada espécie a energia ponderada resultante da análise conformacional.

As imagens das estruturas moleculares foram obtidas por meio do software CYLView.¹¹²

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A reatividade dos derivados de IMZ frente ao triéster de fosfato DEDNPP foi investigada por meio de estudos cinéticos, análises por RMN, EM e cálculos teóricos. Vale ressaltar que o DEDNPP é comumente adotado como éster modelo, por ser um organofosforado relativamente reativo, permitindo que os estudos cinéticos sejam realizados em tempo hábil. Como mencionado, uma das características mais importantes dos ésteres de fosfato é a estabilidade, como observado para o pesticida paraoxon (dietil-4-nitrofenil fostato), que apresenta tempo de meia-vida acima de 3×10^4 anos frente à hidrólise,¹¹³ enquanto para DEDNPP esse valor é de aproximadamente de 50 dias, mesmo apresentando estruturas similares. Mesmo assim, estudos evidenciam que o mecanismo de reação de clivagem é análogo em ambos os substratos.¹¹³ Portanto, nesse trabalho, a reatividade de diversos derivados de IMZ, incluindo alguns fármacos, foi avaliada frente ao triéster DEDNPP. Além dos estudos cinéticos em água, o efeito do solvente (misturas DMSO/água) na reatividade do IMZ e do 1MEI também foi investigado. Ainda, foi foco compreender o efeito dos substituintes metila e hidroxila na reatividade do IMZ e, por fim, buscou-se idealizar um novo catalisador com reatividade ótima utilizando cálculos teóricos. Os resultados apresentados e discutidos a seguir foram divididos em (i) reatividade de fármacos derivados de IMZ; (ii) reatividade de metilimidazóis; (iii) o efeito do solvente na reatividade do IMZ e 1MEI, (iv) reatividade de hidroximidazóis e (v) design de novos catalisadores através de cálculos teóricos.

4.1. Reatividade de fármacos derivados de imidazol

Os fármacos ABZ, BNZ e MTZ (Esquema 25) estão incluídos na relação nacional de medicamentos essenciais (RENAME) e são amplamente prescritos como antiparasitários.³⁴ O ABZ apresenta eficácia no combate a ascaridíase, enquanto o BNZ é geralmente indicado para tratamento de doença de Chagas e o MTZ é utilizado no combate à giardíase.³⁴ O MMZ, por sua vez, é uma importante droga administrada em casos de hipertireoidismo.³⁴ Cabe reiterar que explorar a reatividade desses medicamentos frente a ésteres de fosfato pode trazer

importantes informações para pesquisas relacionadas com efeitos de substituintes, a estudos a respeito de efeitos colaterais e também para o design de novas drogas.

4.1.1. Ensaios para dissolução e estudos cinéticos

Levando em consideração que os estudos cinéticos com os fármacos foram propostos em meio aquoso, inicialmente foram otimizadas as condições para dissolução dos fármacos. Como esperado, ABZ e BNZ apresentam baixa solubilidade em água e, portanto, foram realizados ensaios de dissolução em diferentes meios, como etanol, DMSO, misturas binárias aquosas com solventes orgânicos, adição de surfactantes CTAB e SDS, além do uso de outros agentes macromoleculares como goma arábica e β -ciclodextrina. Em solução aquosa também foram avaliadas alterações da acidez e basicidade do meio. O ABZ apresentou concentração máxima menor que 10^{-5} mol L⁻¹ em água e a utilização de CTAB como surfactante resultou em um discreto aumento para $2,5 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹. A adição de SDS, goma arábica e β -ciclodextrina, assim como alterações de pH do meio não indicaram influência na dissolução do fármaco. Entretanto, o composto apresentou significativo aumento de solubilidade em etanol absoluto e DMSO, com concentrações de $3,3 \times 10^{-3}$ e $1,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹, respectivamente. Nos ensaios utilizando misturas binárias aquosas de solventes, foi constatada concentração máxima de ABZ de 5×10^{-4} mol L⁻¹ em 50/50 (v/v) etanol/H₂O e $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ em 60/40 (v/v) DMSO/H₂O.

De forma similar, houve insignificante influência de agentes surfactantes na solubilidade do BNZ em água ($1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹). A utilização de DMSO aumentou significativamente a solubilidade do BNZ, sendo possível atingir $1,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ em solvente puro e até $1,0 \times 10^{-3}$ com 30/70 (v/v) DMSO/H₂O. O fármaco MTZ, por sua vez, apresentou solubilidade suficiente para o preparo de solução aquosa $0,04$ mol L⁻¹ e $0,4$ mol L⁻¹ em DMSO. Portanto, devido às concentrações alcançadas, misturas DMSO/H₂O foram os meios escolhidos para a condução dos estudos cinéticos envolvendo ABZ e BNZ, enquanto os fármacos MTZ e MMZ foram avaliados com experimentos realizados em água.

Para avaliar a reatividade dos fármacos, a banda em 400 nm referente ao DNP, produto típico da clivagem do DEDNPP, foi monitorada durante a reação. Os

perfis resultantes foram ajustados utilizando as Equação 11, e as constantes de velocidade de segunda ordem referente a cada nucleófilo (k_N) foram obtidas a partir de k_{obs} por meio da Equação 4, em seus respectivos meios. Cabe ressaltar que a contribuição da solvólise (k_0) em cada ambiente reacional foi previamente determinada sem a presença dos fármacos e contabilizada na determinação de k_N , com resultados resumidos na Tabela 4. Assim, foi observado que os fármacos MTZ e BNZ não apresentaram reatividade significativa com o DEDNPP, sendo esse comportamento associado à presença do NO_2 , grupo fortemente retirador de densidade eletrônica, que acarreta na redução da nucleofilicidade do anel de IMZ. Para confirmar essa hipótese, estudos cinéticos da reação do 4(5)NZ com DEDNPP foram realizados e, de fato, o derivado monossustituído não apresentou reatividade significativa frente ao DEDNPP, sendo contrastante ao alto poder catalítico apresentado pelo IMZ¹⁸ (aproximadamente 110 vezes menor). Portanto, dada a elevada influência desse substituinte, não se pode considerar que o 4(5)NZ seja um nucleófilo para processos de desfosforilação. Esse resultado está em consonância com a diferença na basicidade do derivado nitrado em comparação ao IMZ, tendo em vista seus os valores de pK_{aH} de -0,05 e 6,95,⁴ respectivamente. O ABZ, por sua vez, apresentou incrementos catalíticos de quase três ordens de grandeza com relação à hidrólise não alcalina do triéster, porém ainda 10 vezes menor comparada ao IMZ¹⁸ nas mesmas condições experimentais.

Tabela 4. Parâmetros cinéticos dos derivados de IMZ na reação com DEDNPP.

Nucleófilo	Meio ^a	$k_N(\text{M}^{-1} \text{s}^{-1})$ ^b	Incremento $k_N/k_{\text{não}}^c$
MTZ	100% H ₂ O, pH 10,7	$1,29 \times 10^{-4}$	^d
BNZ	80%/20% DMSO/H ₂ O	$1,23 \times 10^{-4}$	20
ABZ	30%/70% DMSO/H ₂ O	$2,46 \times 10^{-3}$	888
IMZ	100% H ₂ O, pH 10,0	$1,79 \times 10^{-2}$	$1,24 \times 10^5$
MMZ	100% H ₂ O, pH 10,5	$5,46 \times 10^{-2}$	$3,79 \times 10^5$

^acomposição em que houve maior reatividade do nucleófilo. ^bCalculada por meio da Equação 4. ^c $k_{\text{não}}$ corresponde à constante de segunda ordem relativa apenas à solvólise, calculada dividindo k_0 pela concentração de água). ^d não apresentou reatividade.

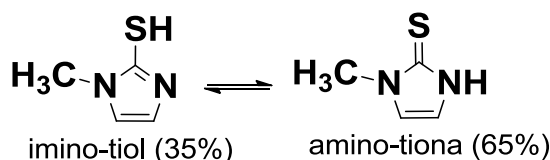
Ainda de acordo com os resultados apresentados na Tabela 4, pode-se observar que, dentre os fármacos avaliados, o MMZ foi o derivado que apresentou a maior reatividade frente ao DEDNPP, levando a incrementos catalíticos na ordem de 10^6 vezes comparado à hidrólise espontânea não alcalina. Portanto, devido ao expressivo resultado observado, a reação do MMZ com DEDNPP foi investigada em maiores detalhes.

4.1.2. Reatividade do fármaco metimazol

No Brasil, o MMZ é comercializado com o nome Tapazol[®], sendo um medicamento amplamente prescrito para controle da produção excessiva de hormônios tireoidianos e estudos direcionados à compreensão detalhada de sua reatividade ainda são escassos na literatura. Diante desse cenário e também em virtude da alta atividade catalítica comparada aos demais fármacos e ao próprio IMZ, a reação do DEDNPP com MMZ foi avaliada em maior profundidade por estudos cinéticos, EM e cálculos teóricos.

O fármaco MMZ, que apresenta pK_a 11,64,¹¹⁴ pertence a uma classe de compostos nucleofílicos ambifuncionais,¹¹⁵ visto que em sua forma neutra apresenta equilíbrio tautomérico entre as estruturas imina-tiol e amina-tiona, sendo essa última a mais estável, conferindo-a 65% na distribuição populacional,¹¹⁵ como mostrado no Esquema 27. Assim, o tautomerismo entre os dois grupos funcionais confere ao MMZ reatividade peculiar, tendo em vista a possibilidade de atuar com ataques nucleofílicos via nitrogênio ou enxofre.

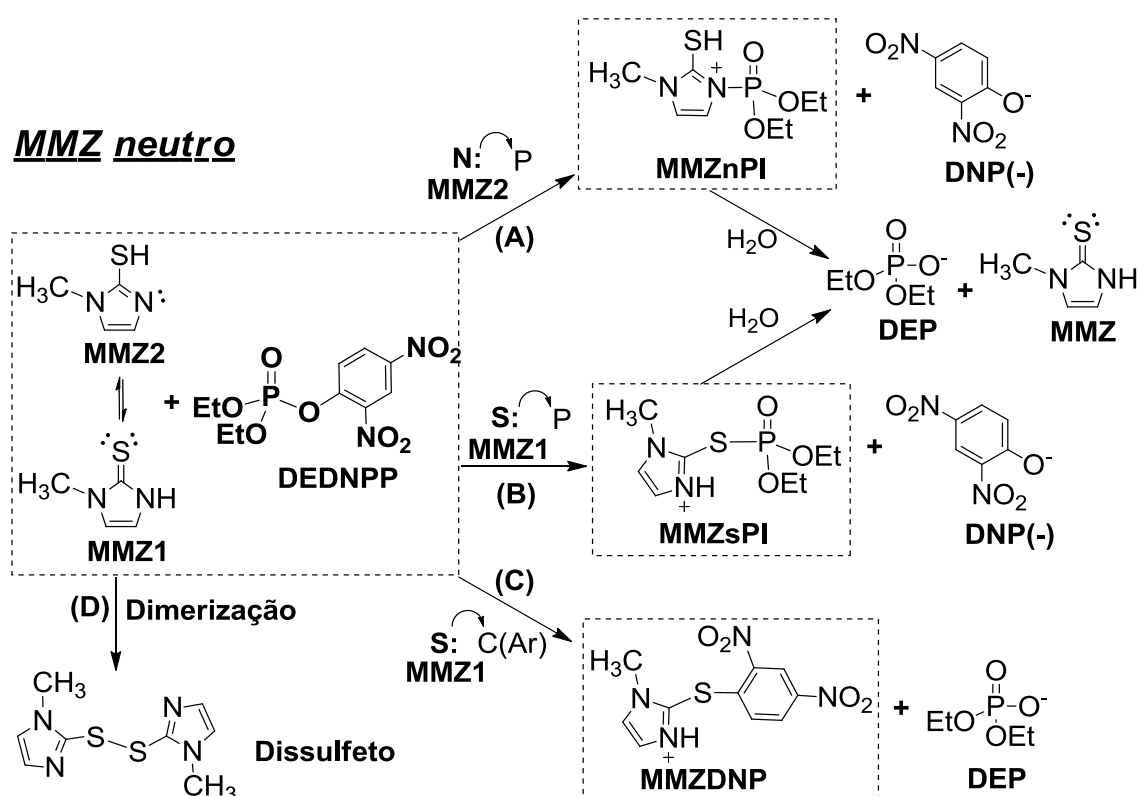
Esquema 27. Tautomerismo do MMZ.



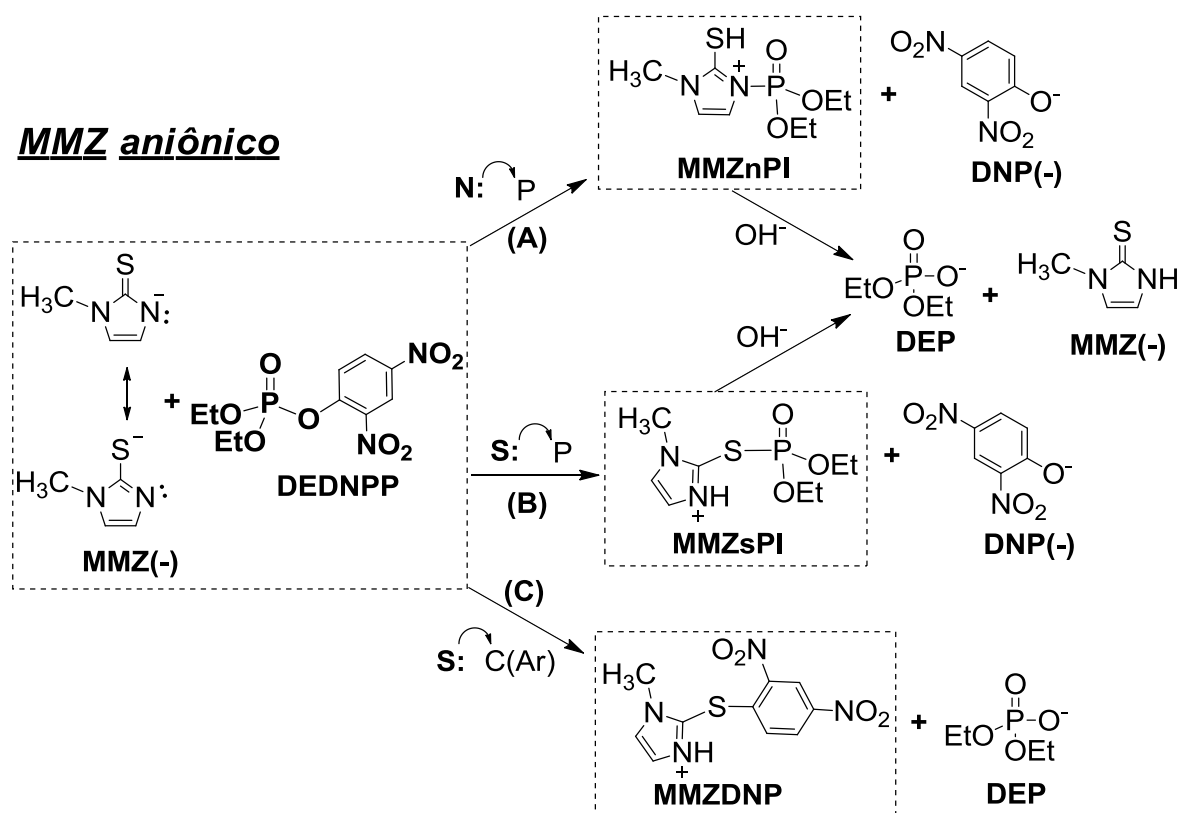
Mediante tais constatações referentes à sua basicidade e tautomerismo, foi proposto que a reação do MMZ com o DEDNPP pode apresentar caminhos competitivos, com ataque nucleofílico do (A) nitrogênio ao fósforo, (B) enxofre ao fósforo e (C) enxofre ao carbono aromático do DEDNPP, como mostrado nos Esquemas 28 e 29, referentes ao MMZ neutro e aniônico, respectivamente. Nas

reações via fósforo, os mecanismos se diferenciam apenas pelo centro nucleofílico, com os ataques pelo nitrogênio (A) e enxofre (B), levando à formação dos intermediários MMZnPI e MMZsPI, respectivamente, além da produção de DNP nesses dois caminhos (Esquemas 28 e 29). No caso específico do intermediário MMZnPI, este deve ser facilmente hidrolisado devido à presença da fraca ligação fosforil-imidazolínio ($P-N^+$),¹¹⁶ levando ao produto dietil-fosfato (DEP) e à regeneração do MMZ. Em contrapartida, no mecanismo C, referente à substituição nucleofílica aromática pelo enxofre, além de não haver formação de DNP, ocorre produção de MMZDNP, que é estável frente a hidrólise e, portanto, permanece em solução (*vide infra*). Cabe ressaltar que o IMZ não apresenta reatividade perante o 1-cloro-2,4-dinitro-benzeno,¹⁸ ou seja, não é esperado um ataque do IMZ ao carbono do anel aromático e, portanto, a substituição nucleofílica aromática pelo nitrogênio foi descartada no caso da reação do MMZ com DEDNPP. Apesar disso, essa mesma reação envolvendo outros centros nucleófilos é conhecida (e.g. com hidroxilamina)¹¹⁷ e, por essa razão, o ataque do enxofre ao carbono aromático foi considerada uma rota plausível.¹¹⁸ Será mostrado a seguir que a dimerização do MMZ também é uma reação importante a se considerar.

Esquema 28. Caminhos propostos para reação do MMZ neutro com DEDNPP.



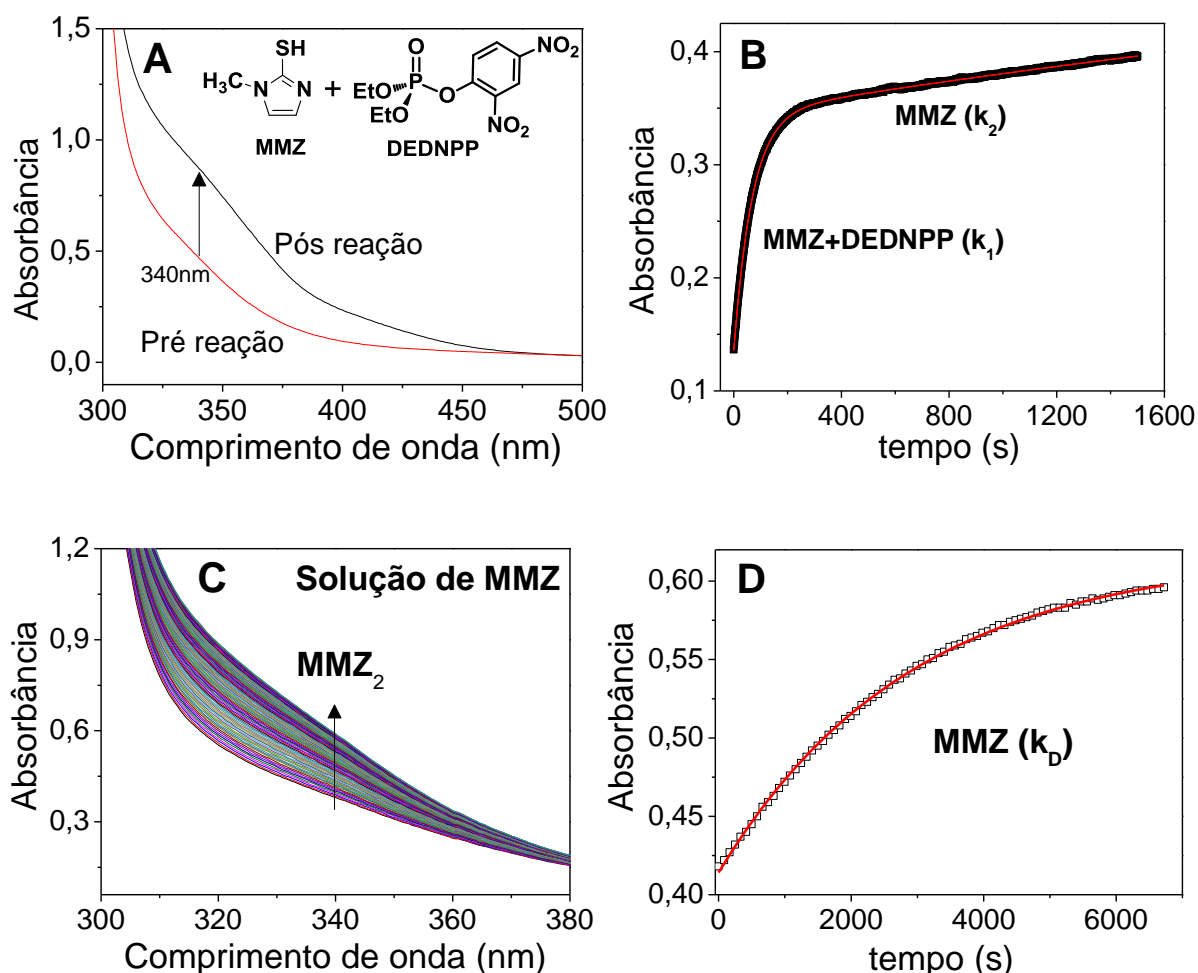
Esquema 29. Caminhos propostos para reação do MMZ aniônico com DEDNPP.



Conforme mencionado na sessão 3.2, o DNP, produto típico da clivagem da ligação P-O do DEDNPP, apresenta bandas com absorvâncias similares em 360 e 400 nm, como mostrado na Figura 6B. No entanto, no estudo cinético da reação envolvendo o MMZ, foi observada uma banda não peculiar com absorvância máxima em 340 nm (Figura 7A). Além disso, o perfil cinético referente ao aparecimento da banda em 340 nm mostrou-se compatível com duas reações concomitantes de primeira ordem, como mostrado na Figura 7B. Essa evidência é um indicativo de que a reação tenha alguma rota competitiva ao ataque via fósforo, visto que o comportamento típico de clivagem P-O do DEDNPP no espectro de UV-Vis (bandas em 360 e 400 nm) não foi predominante. De fato, em pH 10,5 observou-se um aumento de apenas 0,14 na absorvância da banda em 400 nm associada à formação do DNP, enquanto a banda em 340 nm apresentou aumento de 0,40 (Figura 7A). Em pH 10,5, caso a reação do MMZ não fosse efetiva com DEDNPP, se esperaria observar a hidrólise alcalina (OH^-) do DEDNPP, que gera DNP. Porém, mesmo acompanhando a reação por mais tempo (1,5 h) não houve aumento significativo (superior a 0,14 unidade) na banda em 400 nm, indicando que o MMZ é

responsável pelo consumo do DEDNPP. Dessa forma, os dados sugerem que a reação do triéster com o fármaco ocorre por um caminho que não gera DNP preferencialmente, *i.e.*, forma outro(s) produto(s) detectado(s) em 340 nm. Os dados de absorvância, obtidos pelo monitoramento da banda em 340 nm, foram ajustados utilizando a Equação 12, compatível com ocorrência duas reações de primeira ordem, sendo o índice 1 referente à espécie formada pela reação do MMZ com DEDNPP, enquanto o 2 foi atribuído ao produto da dimerização do fármaco, como discutido na sequência.

Figura 7. **A.** Espectros pré e pós reação do MMZ a $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ com DEDNPP em pH 10,5; **B.** Perfil obtido da reação do MMZ a $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ com DEDNPP (k_1) e formação do dímero MMZ₂ em 340 nm (k_2) a 25 °C; **C.** Espectros sucessivos adquiridos da solução de MMZ a $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ com formação de MMZ₂ a 25 °C. **D.** Ajuste dos dados obtidos a partir dos espectros sucessivos da solução de MMZ (k_D).



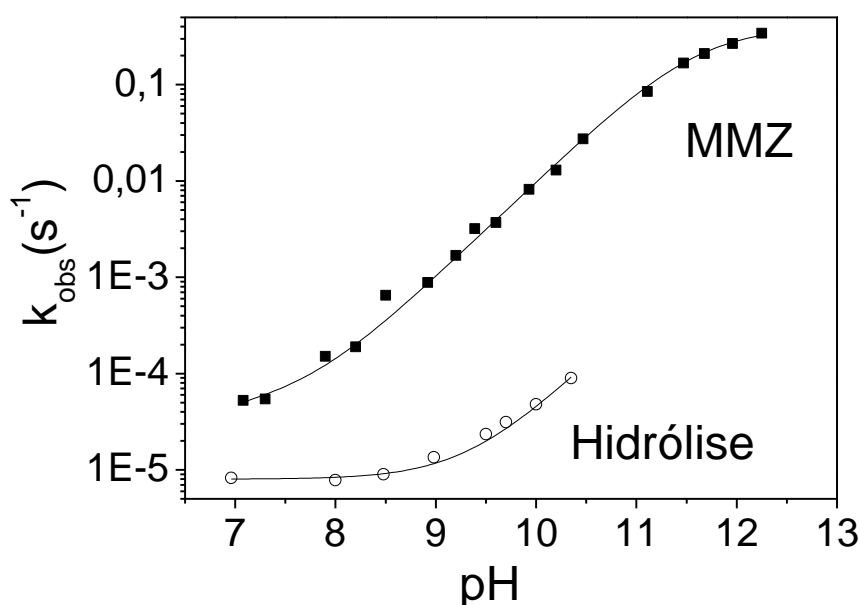
$$A_t = A_0^1 + (A_\infty^1 - A_0^1)(1 - e^{-k_1 t}) + (A_\infty^2 - A_0^2)(1 - e^{-k_2 t}) \quad (12)$$

Para investigar a origem de k_2 (Figura 7B) foi realizado o monitoramento espectrofotométrico apenas da solução de MMZ, ou seja, sem a presença de DEDNPP, como mostrado na Figura 7C. Curiosamente, foi observado um aumento da absorvância em 340 nm (Figura 7C), compatível com uma possível reação de dimerização do MMZ, por meio da formação de ligação S-S.¹¹⁹ Após ajuste da curva obtida com esses dados (Figura 7D), foi determinado que a constante de velocidade para a sugerida reação de dimerização do MMZ, k_D , é, de fato, muito similar a k_2 , obtida pelo ajuste dos dados da reação do fármaco com DEDNPP, sendo respectivamente $1,89 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ e $1,64 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$. Diante dessas evidências, foi proposto que na reação do DEDNPP com MMZ, o perfil das duas reações de primeira ordem da banda em 340 nm (Figuras 7A e 7B) é referente: (k_1) ataque do enxofre ao carbono aromático, levando à formação do intermediário MMZDNP (Esquemas 28 e 29, caminho C, com ataque do enxofre ou nitrogênio ao fósforo ocorrendo em menor grau, devido à pequena formação do produto DNP observada em 400 nm) e (k_2) espécie formada pela dimerização do MMZ (Esquema 28, caminho D). Após o fim da etapa de reação referente a k_1 , foi adicionado hidróxido de sódio concentrado ao meio reacional, porém não foi observado aumento na região de 400 nm, mesmo após 3 h de monitoramento. Essa evidência indica que não houve decomposição do MMZDNP com liberação de DNP, sugerindo alta estabilidade frente a hidrólise alcalina e, portanto, correspondendo ao produto da reação. Cabe ressaltar, ainda, que a constante de velocidade da primeira etapa (k_1) apresenta valores quase duas ordens de grandeza maiores do que aquela da segunda etapa (k_2), indicando que a dimerização (k_D) é muito mais lenta que as reações envolvendo o DEDNPP, também confirmado em outros valores de pH avaliados (ver apêndice). Foi observado que esse processo de dimerização causou alterações discretas na velocidade de reação com DEDNPP (k_1), quando a solução de MMZ era estocada por mais de uma semana. Portanto, todas as soluções foram preparadas imediatamente antes de iniciar as reações.

Posteriormente, uma avaliação mais detalhada acerca da influência do pH do meio na reação do MMZ com DEDNPP foi avaliada e os dados experimentais estão apresentados na Figura 8. As constantes de velocidade para a composição do perfil

de pH foram determinadas em função apenas da reação entre o fármaco e o DEDNPP (k_1), obtidas por ajustes com equação cinética de primeira ordem (Equação 11, com $k_1=k_{obs}$). É importante salientar que em toda faixa de pH avaliada, foi observado menor aumento da banda em 400 nm que o esperado, em comparação à reação ocorrendo unicamente via liberação de DNP. Isso sugere que a formação de DNP tenha rota competitiva de ataque ao carbono aromático independentemente do pH do meio. Assim, devido ao aumento mais pronunciado, o perfil de pH foi determinado em função da banda em 340 nm. Pode-se observar na Figura 8, que a constante de velocidade aumenta com o pH até aproximadamente 11,5, comportamento típico devido à formação da espécie aniônica do MMZ (MMZ^{-1} ; $pK_a(MMZ)=11,6$),¹¹⁴ sendo essa mais reativa que o MMZ neutro. Essa evidência é compatível com as reações mostradas nos Esquemas 28 e 29, em que o MMZ neutro e aniônico atuam em mecanismos similares, porém com a espécie carregada detendo maior poder nucleofílico. O ajuste dos dados experimentais foi realizado por meio da Equação 4, considerando as contribuições da hidrólise alcalina (k_{OH}) do substrato em cada pH, da hidrólise espontânea do éster de fosfato (k_0) e da reatividade do nucleófilo (k_N).

Figura 8. Perfil cinético em função do pH referente à reação do DEDNPP com MMZ ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$) e hidrólise espontânea do DEDNPP,⁷ ambos obtidos a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. As linhas sólidas correspondem aos ajustes pela Equação 4.



Assim, os parâmetros cinéticos da reação foram determinados e os resultados estão apresentados na Tabela 5. Quando comparada à hidrólise espontânea, a clivagem do DEDNPP mediada por MMZ apresentou surpreendente incremento catalítico na ordem de 10^6 vezes, sendo 45 vezes mais reativo que o próprio IMZ, com atividade nucleofílica atribuída principalmente à forma aniônica do fármaco. Ainda, cabe mencionar que um perfil linear de k_{obs} em função da concentração do MMZ foi observado na reação com o DEDNPP, sendo consistente com reação bimolecular e indicando que o mecanismo não muda na faixa de concentração avaliada (ver apêndice).

Tabela 5. Parâmetros cinéticos e termodinâmicos da reação do MMZ^a com DEDNPP.^b

Parâmetro	Valor	Parâmetro	Valor
$k_0, ^{120} \text{ s}^{-1}$	$8,0(\pm 0,5) \times 10^{-6}$	$\Delta H^\ddagger, \text{ kcal mol}^{-1}$	$10,3 \pm 0,2$
$k_{OH}, ^{120} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$0,25 \pm 0,02$	$\Delta S^\ddagger, \text{ cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$	$-30,9 \pm 1,33$
$k_N, \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$0,78 \pm 0,0086$	$\Delta G^\ddagger, \text{ kcal mol}^{-1}$	$19,5$

^a 0,5 mol L⁻¹. ^b pH 10,5 e 298 K.

Para a determinação dos parâmetros termodinâmicos, as reações foram realizadas em cinco diferentes temperaturas. Com a obtenção do coeficiente angular da regressão linear do plot de Eyring (Equação 13) calculou-se a variação de entalpia de ativação (ΔH^\ddagger) e, posteriormente, a energia livre (ΔG^\ddagger) e a entropia de ativação (ΔS^\ddagger) a partir das Equações 14 e 15, respectivamente. Os resultados estão apresentados na Tabela 5 (gráfico no apêndice). De fato, os valores altamente negativos de entropia de ativação são um indicativo de que a reação ocorre via mecanismo nucleofílico¹²¹ e estão de acordo com a proposta mecanística apresentada nos Esquemas 28 e 29.

$$\ln\left(\frac{k_{obs}}{T}\right) = \left[\ln\left(\frac{k_b}{h}\right) + \frac{\Delta S^\ddagger}{R}\right] - \frac{\Delta H^\ddagger}{R} \left(\frac{1}{T}\right) \quad (13)$$

$$\Delta G^\ddagger = -\ln\left(\frac{k_{obs}h}{k_b T}\right) RT \quad (14)$$

$$\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger \quad (15)$$

Sendo k_b a constante de Boltzmann ($1,381 \times 10^{-23} \text{ m}^2 \text{ kg s}^{-2} \text{ K}^{-1}$), h a constante de Planck ($6,626 \times 10^{-34} \text{ m}^2 \text{ kg s}^{-1}$) e R a constante dos gases ($8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$)

Os resultados obtidos até então indicam que a reação entre o MMZ e o DEDNPP é peculiar, com mecanismo preferencial do ataque do enxofre do MMZ ao carbono aromático do triéster, levando a um intermediário estável. No entanto, a contribuição do ataque nucleofílico ao fósforo, pelo enxofre ou nitrogênio do MMZ, deve ser considerada, visto que também foi observada formação significativa do produto DNP, que provem unicamente dessa etapa. Assim, devido aos múltiplos caminhos reacionais possíveis, cálculos teóricos e análises por EM foram propostos para elucidar essa da alta reatividade do fármaco em maior nível de detalhamento.

4.1.2.1. Elucidação mecanística por espectrometria de massas

Procurando fundamentar as hipóteses levantadas pelo estudo cinético e avaliar o caráter ambimucleofílico do MMZ, a reação do medicamento com DEDNPP foi submetida a análises de EM nos modos positivo e negativo. No espectro adquirido da reação no modo positivo (Figura 9), foram observados sinais com m/z 115 e 153 Da, sendo referentes ao MMZ protonado e ao produto final DEP, respectivamente. Outro importante sinal com m/z 251 Da foi detectado, sendo condizente com a estrutura de ambos os intermediários formados pelos ataques via fósforo (MMZnPI ou MMZsPI). Como mostrado na Figura 10, após submissão de íon (m/z 251 Da) a ESI-MS/MS, foi obtido fragmento detectado a 137 Da, reafirmando que o sinal é pertencente a um desses intermediários, visto que é condizente com a estrutura do PO_3Et_2^+ . No entanto, por essa técnica não foi possível distinguir qual dos dois é o intermediário detectado. O produto MMZDNP, resultante do ataque do enxofre do MMZ ao carbono aromático do DEDNPP, também foi detectado no espectro adquirido da reação (Figura 9), com um sinal de baixa intensidade de m/z 281. No entanto, esse íon foi submetido ao ESI-MS/MS com abundância suficiente e apresentou fragmentos iônicos que sugerem clivagens condizentes à perda dos grupos NO_2 (m/z 235 e 189 Da, Figura 11). Isso confirma o caminho reacional pelo ataque nucleofílico do enxofre do MMZ ao carbono aromático levando ao produto de substituição nucleofílica aromática, MMZDNP. Vale ressaltar que seu sinal de menor intensidade em relação ao demais (e.g. $m/z=281$), não indica diretamente que ele está em menor concentração, pois também está relacionado à facilidade de ionização das espécies. Ainda na Figura 9, não foi possível atribuir as estruturas relativas aos sinais com m/z 265 e 267 Da. Já no espectro da reação adquirido no

modo negativo, foi observado sinal com m/z 183 Da, indicando a formação do produto DNP (ver apêndice), sendo este íon resultante da reação do MMZ com DEDNPP ocorrendo via fósforo.

Figura 9. Espectro de massas no modo positivo adquirido da reação do MMZ ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$) e DEDNPP em pH 10,5 a $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

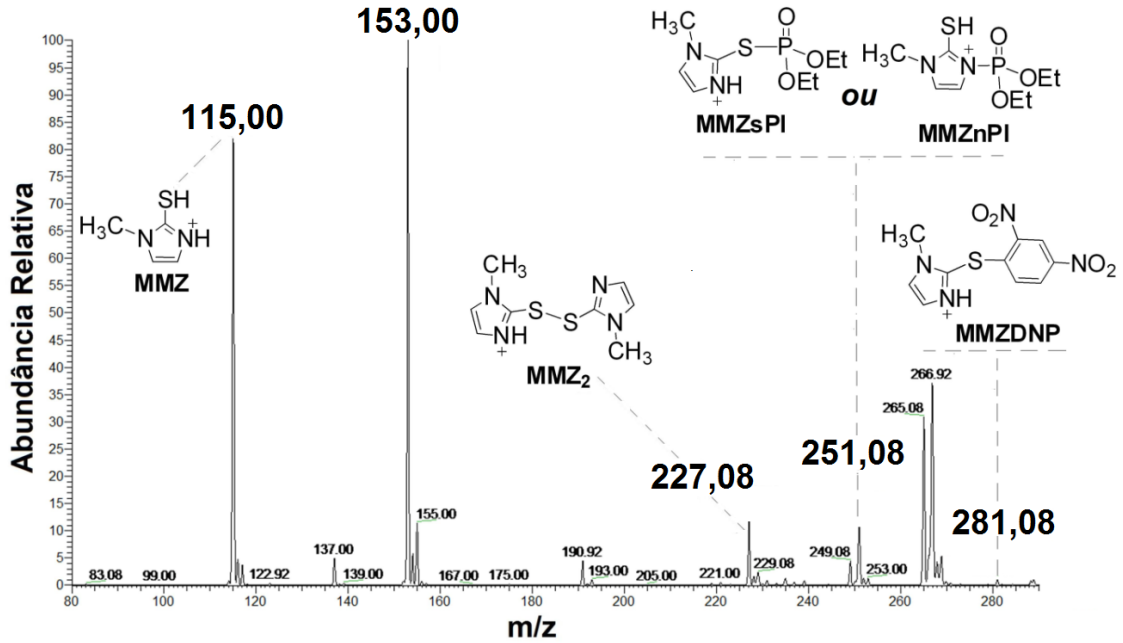


Figura 10. ESI-MS/MS(+) do cátion de m/z 281 Da (MMZDNP)

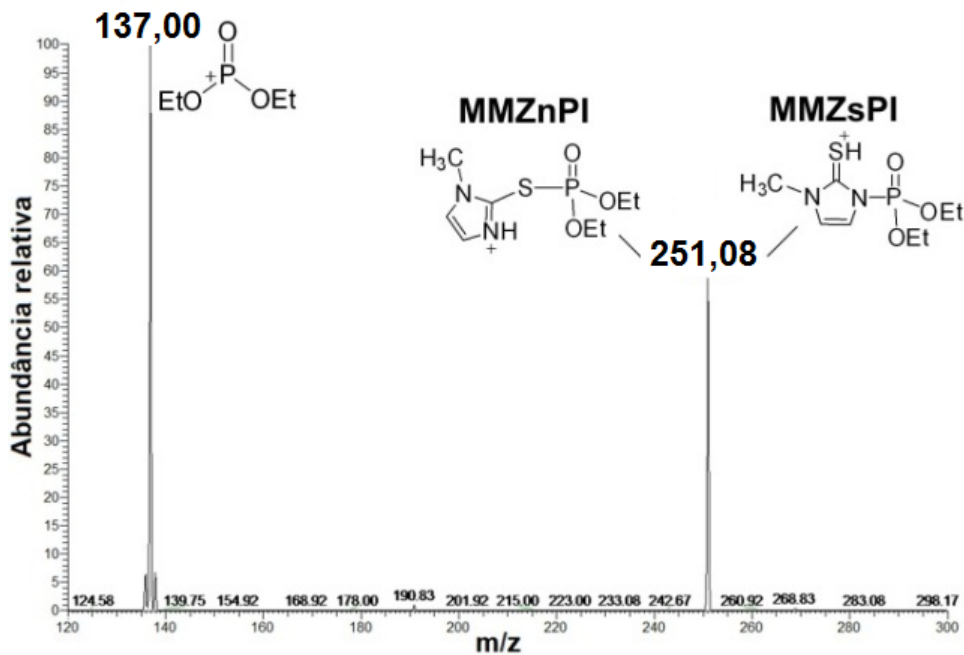
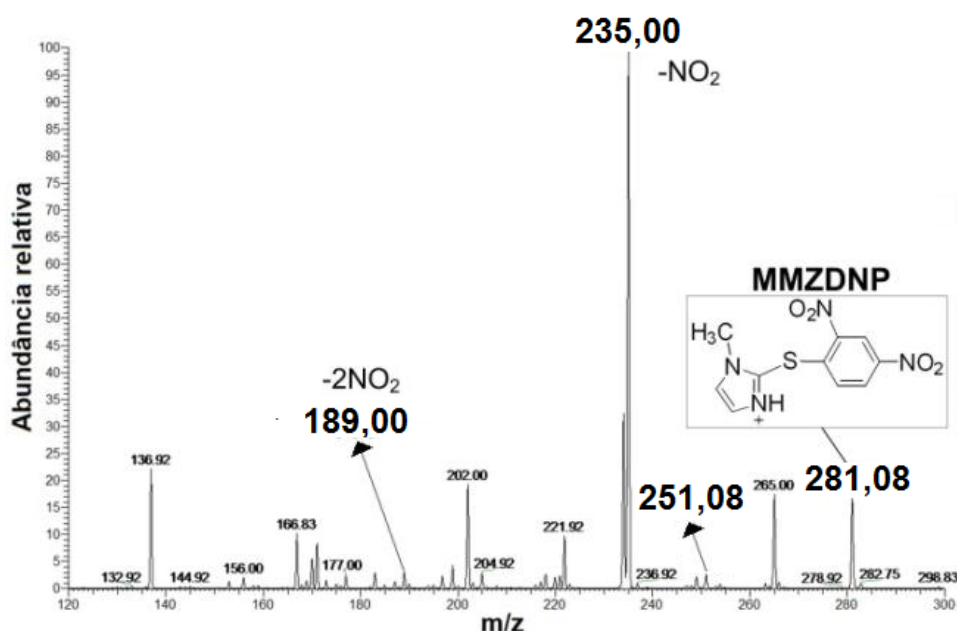


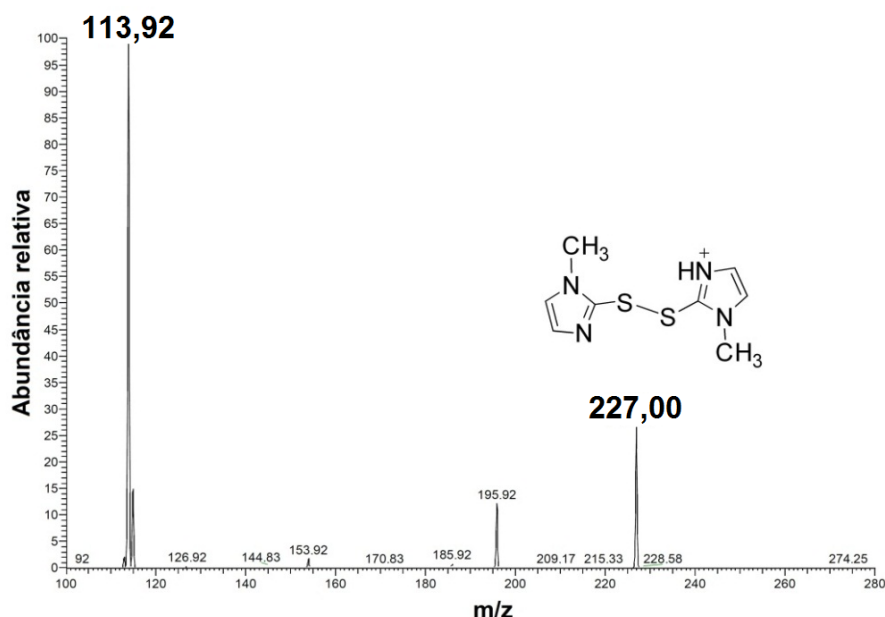
Figura 11. ESI-MS/MS(+) do cátion de m/z 251 (MMZnPI ou MMZsPI) adquiridos da reação do MMZ ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$) e DEDNPP em pH 10,5 a $25 \text{ }^\circ\text{C}$.



A formação do dímero de MMZ (Esquema 28) também foi confirmada na presença e na ausência de DEDNPP, pelo sinal detectado com m/z 227 Da no espectro da reação (Figura 9). Ainda, como observado na Figura 12, submetendo esse íon a ESI-MS/MS foi obtido sinal em 114 Da, resultante da perda do fragmento MMZ, ratificando a reação de dimerização.

Assim, os múltiplos caminhos reacionais resultantes da competição entre os ataques do MMZ ao fósforo e ao carbono aromático foram confirmados, corroborando o estudo cinético por UV-Vis. Entretanto, devido a impossibilidade de diferenciar as espécies MMZnPI e MMZsPI por espectrometria de massas, cálculos teóricos foram realizados para averiguar as barreiras reacionais mais favoráveis na reação entre o MMZ e o fosfotriéster. Apesar disso, as evidências experimentais reiteram o caráter ambínucleofílico do fármaco MMZ, visto que foram observados sinais compatíveis com todos os caminhos reacionais propostos nos Esquemas 28 e 29.

Figura 12. ESI-MS/MS(+) do cátion com m/z 227 Da (MMZ_2) adquirido da reação de dimerização do MMZ a $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 10,5 a $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

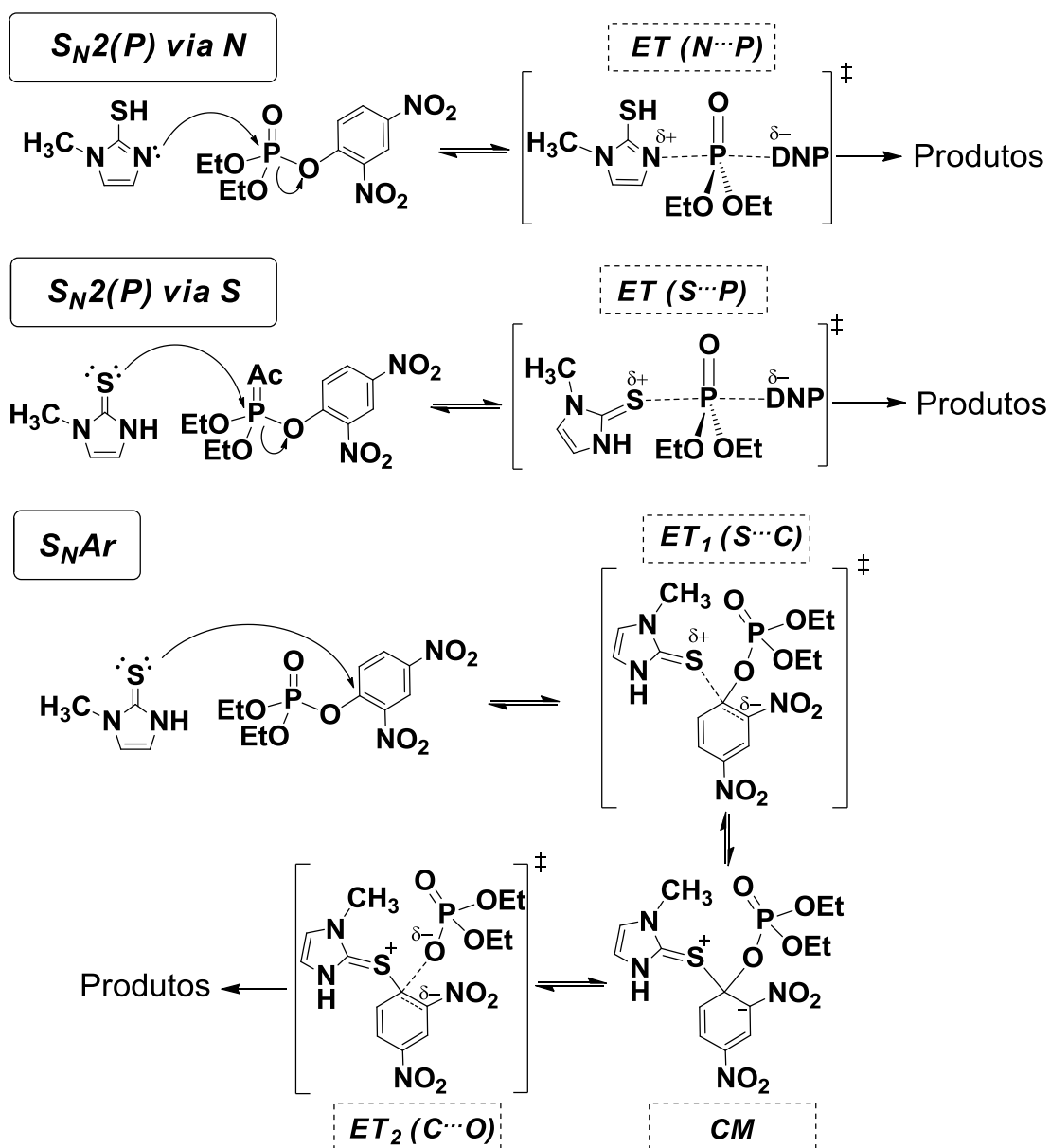


4.1.2.2. Elucidação mecanística por cálculos teóricos

Visando complementar os resultados obtidos experimentalmente, cálculos teóricos utilizando o método B3LYP/6-31+g(d,p) considerando a presença de água como solvente implícito (smd) foram propostos para obtenção das barreiras energéticas em cada rota e, conseqüentemente, determinar o mecanismo mais favorecido na reação envolvendo o DEDNPP com MMZ. Como mostrado no estudo cinético, em pHs próximos ao pK_a do fármaco houve potencialização da atividade nucleofílica do MMZ, devido ao aumento da concentração da espécie aniônica mais reativa. Por isso, foram realizados cálculos referentes às reações apresentadas nos Esquemas 28 e 29, considerando o fármaco na forma neutra, que apresenta tautômeros de estruturas diferentes, e aniônica. Era esperada uma maior nucleofilicidade para a espécie aniônica, em contraste à neutra, resultante da maior densidade eletrônica distribuída principalmente nos átomos de nitrogênio e enxofre. Com base nos mecanismos propostos no Esquema 28 e 29 e nos resultados obtidos na determinação dos parâmetros termodinâmicos (Tabela 5), mecanismos nucleofílicos foram inicialmente propostos para todas as reações. Assim, nos casos em que o fósforo atua como eletrófilo (caminhos A e B, Esquemas 28 e 29), as estruturas dos ET foram propostas com base no mecanismo de substituição

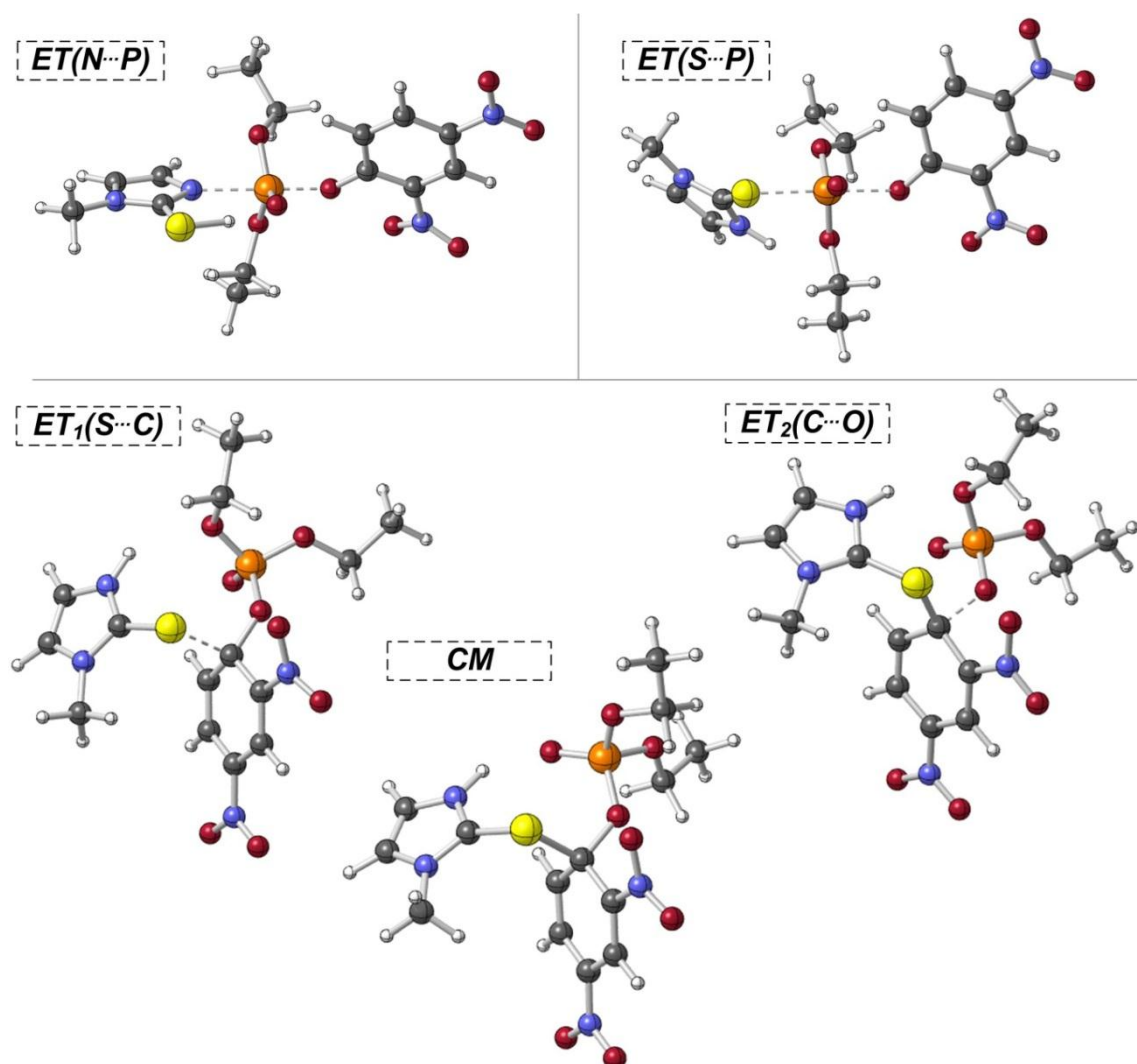
nucleofílica via fósforo $S_N2(P)$, levando à formação dos intermediários MMZnPI ou MMZsPI, como ilustrado no Esquema 30. Já para o ataque do enxofre ao carbono aromático, o mecanismo clássico de substituição nucleofílica aromática (S_NAr) em duas etapas foi proposto, com formação do complexo de Meisenheimer (CM) e subsequente formação do MMZDNP (caminho C, Esquemas 28 e 29). Nesse caso em específico, o mecanismo envolve a formação de dois ET, sendo: (i) $ET_1(S\cdots C)$ referente ao ataque do enxofre ao carbono aromático, levando ao intermediário CM, e (ii) $ET_2(C\cdots O)$ referente à eliminação do diéster e à recuperação da aromaticidade (Esquema 30).

Esquema 30. Mecanismos propostos para a reação do MMZ neutro com DEDNPP via $S_N2(P)$ e S_NAr .



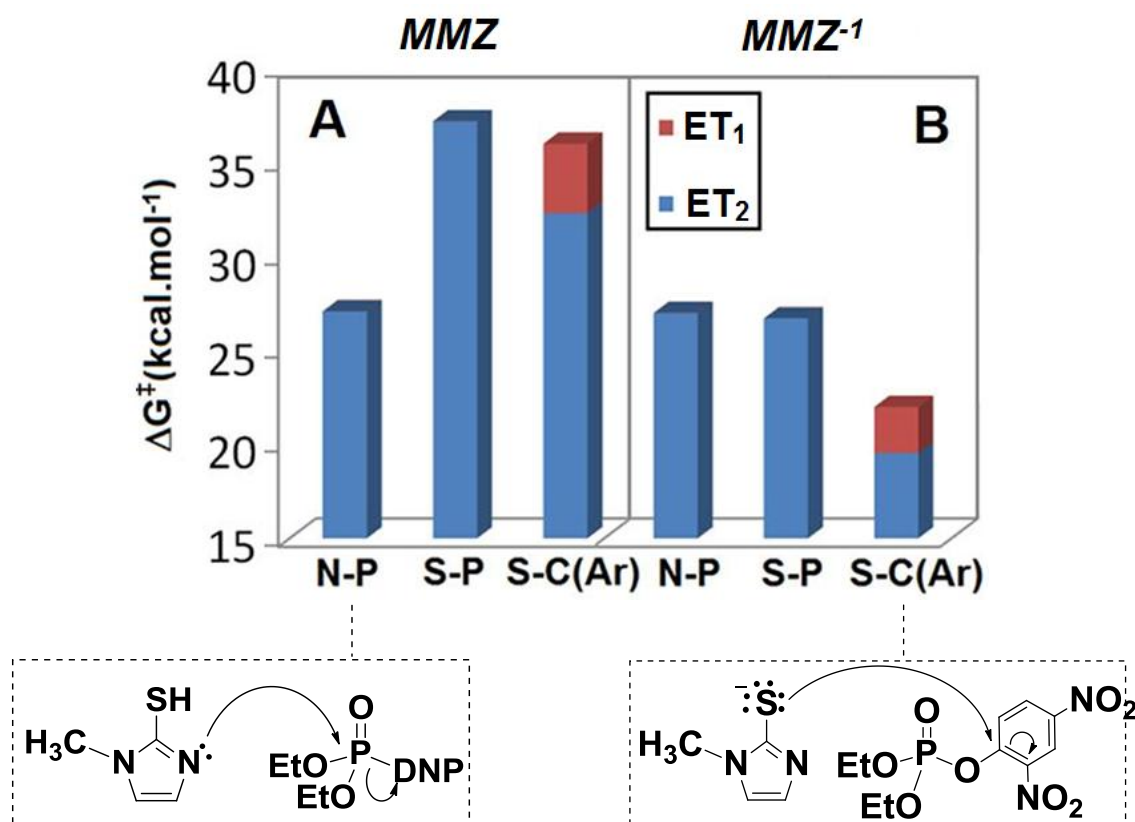
Os resultados de cálculo mostraram-se de acordo com essas propostas, e as estruturas otimizadas de todos os ET foram obtidas e apresentadas na Figura 13. Estruturas similares foram obtidas para os ET envolvendo a forma aniônica do MMZ, porém, sem a presença do hidrogênio responsável pelo tautomerismo no MMZ neutro. Cabe ressaltar que apenas uma frequência imaginária foi obtida para os ETs, enquanto nenhuma foi observada para o CM e outros intermediários. Apesar dos resultados de cálculo sugerirem a formação do CM, este deve ser bastante instável, visto que não foi detectado nas análises por EM realizadas anteriormente.

Figura 13. Estruturas dos ET e intermediário CM da reação do MMZ neutro com DEDNPP obtidos com método B3LYP/6-31+g(d,p), referentes aos ataques do nitrogênio ao fósforo ($N\cdots P$), enxofre ao fósforo ($S\cdots P$), e enxofre ao carbono aromático ($S\cdots C$, $C\cdots O$). Átomo-cor: fósforo-laranja, enxofre-amarelo, oxigênio-vermelho, nitrogênio-azul, carbono-cinza, hidrogênio-branco.



Assim, as energias de Gibbs de ativação foram determinadas para cada mecanismo e estão ilustradas na Figura 14. Os resultados de cálculos sugerem que, em sua forma neutra, o MMZ apresenta o nitrogênio do tautômero imina-tiol como principal centro nucleofílico. O mecanismo relativo ao ataque do nitrogênio do IMZ ao fósforo apresentou a menor barreira reacional, sendo aproximadamente 10 kcal mol⁻¹ mais favorável que as reações em que o enxofre atua como nucleófilo (rotas B e C, Esquema 28). Dentre os caminhos minoritários, pôde-se observar que os ataques da tionila apresentaram similares barreiras de ativação, ao comparar o mecanismo S_N2(P) com ambas as etapas do caminho S_NAr, indicando competição entre as rotas B e C, com formação concomitante das espécies MMZDNP e MMZsPI (Esquema 28). Assim, em ambiente aquoso mais próximo da neutralidade, ou seja, em que não há presença significativa de MMZ aniônico, resultados de cálculo sugeriram a formação majoritária do intermediário MMZnPI, ou seja com ataque do nitrogênio do ao fósforo (Figura 14A).

Figura 14. Barreiras reacionais da reação do DEDNPP com (A) MMZ neutro e (B) MMZ aniônico (B3LYP/6-31+g(d,p)) via ataque do nitrogênio ao fósforo (N-P), enxofre ao fósforo (S-P) e enxofre ao carbono aromático (S-C(Ar) com ET₁ e ET₂).



Considerando o MMZ aniônico, os cálculos mostraram uma inversão das barreiras reacionais em contraste ao MMZ na forma neutra (Figura 14), indicando o S_NAr como o mecanismo mais favorecido na reação com o triéster, acarretando na formação majoritária do produto da substituição nucleofílica aromática (MMZDNP). Quando desprotonado, os dois centros nucleofílicos (N e S) do fármaco apresentaram reatividade similares na rota via $S_N2(P)$, como mostrado na Figura 14B, devido às barreiras reacionais equivalentes. No entanto, a formação dos intermediários resultantes dos ataques aniônicos ao fósforo deve ser minoritária, visto que apresentam barreiras cerca de 5 kcal mol^{-1} mais altas em comparação ao ataque do enxofre ao carbono aromático.

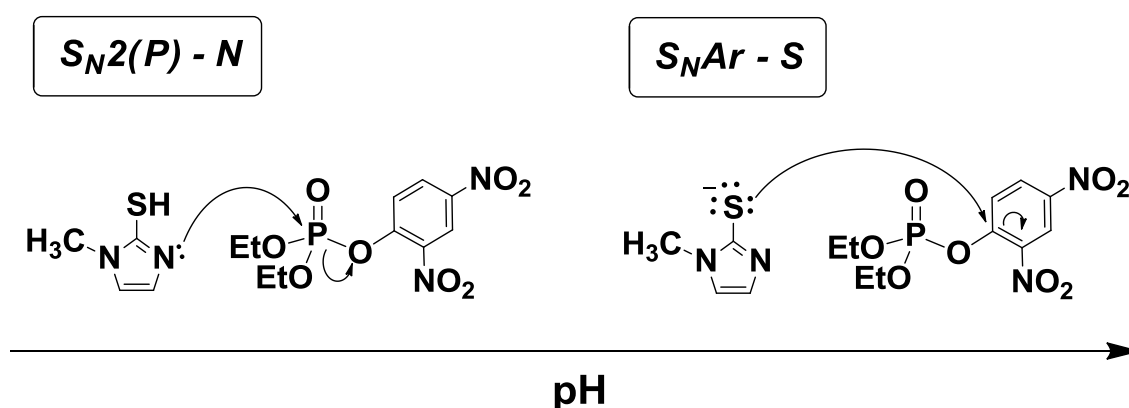
A partir dos estudos cinéticos, realizados em pH 10,5, foi sugerido que a formação de DNP teria reações competitivas e, mediante análises por EM, foi possível detectar intermediários compatíveis com os mecanismos propostos. Entretanto, diante do desafio de atribuir plenamente os caminhos preferenciais pelas técnicas experimentais, a aplicação de metodologias teóricas foram fundamentais para compreensão da reação do fármaco com DEDNPP. A partir dos resultados de cálculos, é possível reafirmar a existência de reações paralelas em pH 10,5, como sugerido nos estudos cinéticos por UV-Vis, sendo representadas pelos ataques ao fósforo pelo MMZ neutro e principalmente ao carbono aromático pelo enxofre do MMZ aniônico, por ter apresentado a menor barreira de ativação. Isso porque nesse pH, a forma aniônica deve estar presente em equilíbrio com uma população de aproximadamente 7,2% ($pK_a^{MMZ}=11,64$), que é significativo para competir com as outras possíveis reações. Além disso, por ser mais reativo, o consumo de MMZ aniônico leva ao deslocamento de equilíbrio no sentido de sua formação, mantendo sua concentração ao longo das reações com o DEDNPP.

4.1.3. Conclusões Parciais

Em síntese, os estudos cinéticos indicaram que os fármacos BNZ e MTZ não apresentam atividade nucleofílica, principalmente devido a presença de grupo NO_2 no anel de IMZ, fortemente retirador de densidade eletrônica. No caso do ABZ, foi observada reatividade significativa, porém 10 vezes menor que o IMZ não substituído, o que não elimina a possibilidade de reações paralelas acarretadas pelo

fármaco no organismo. Perante o elevado incremento catalítico conferido pelo MMZ na clivagem do DEDNPP, comparada à hidrólise do triéster, os mecanismos de reação e os fatores envolvidos na reatividade do fármaco foram investigados por estudos cinéticos detalhados associados a análises por MS e cálculos teóricos. Nesse contexto, considerando a faixa de pH avaliada, o MMZ apresentou reatividade 45 vezes superior que o próprio IMZ,¹⁸ exaltando a alta reatividade da sua forma aniônica. De acordo com os resultados, sugere-se que a formação de DNP decorrente da degradação do DEDNPP apresenta mecanismo competitivo, principalmente se a espécie aniônica do MMZ estiver presente no meio, mesmo que em pequena quantidade. Por conseguinte, os dados obtidos nessa parte do trabalho, indicam o caráter ambinucleofílico para o MMZ, sugerindo que pH do meio modula o mecanismo principal da reação, sendo ora a formação do intermediário MMZnPI pela atuação do MMZ neutro, ora o produto MMZDNP resultante da reação envolvendo o MMZ aniônico, como ilustrado na Figura 15. Essas conclusões foram alcançadas mediante análise conjunta das metodologias teórica e experimentais, permitindo obter uma visão de maior plenitude do sistema, levando a uma melhor compreensão dos resultados.

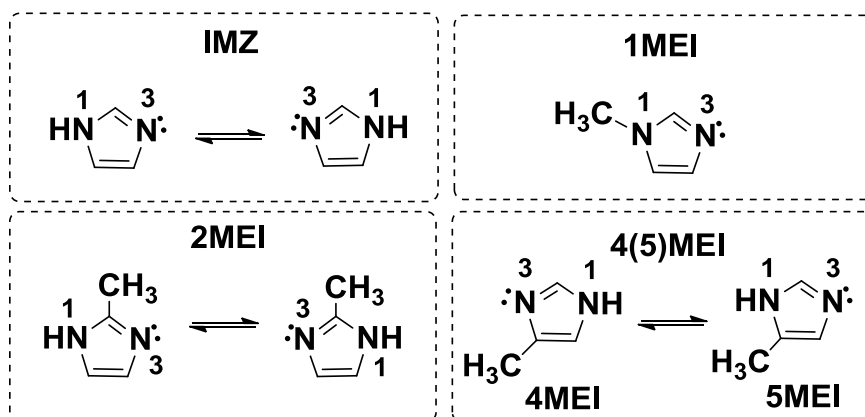
Figura 15. Rotas preferenciais da reação com DEDNPP com MMZ neutro e aniônico. O mecanismo é modulado pelo pH do meio.



4.2. Efeito do substituinte na reatividade do imidazol: metilimidazóis

Devido às peculiaridades observadas no estudo da reação do DEDNPP com MMZ, questionamentos acerca do efeito do grupo metila - e de sua posição - na reatividade do fármaco foram levantados. Assim, estudos teóricos e experimentais foram combinados visando à compreensão detalhada da influência de substituintes específicos nos mecanismos e na reatividade de derivados de IMZ. Metilimidazóis monossustituídos (xMEI) apresentam estruturas de menor complexidade quando comparados aos fármacos ABZ, BNZ, MTZ e MMZ. Apesar disso, sua reatividade ainda não foi concisamente correlacionada com o posicionamento da metila em diversas reações, tais como desfosforilação e desacilação, e diversos estudos vem sendo publicados, mas sem explicar efetivamente como esse grupo afeta a reatividade do IMZ.^{19,20,122-127} Nesse contexto, cabe mencionar que esperar-se-ia que o substituinte metila acarretasse em aumento na nucleofilicidade do IMZ (quando não houver efeito estérico), o que não se observa de forma direta ao estudar metilimidazóis. No Esquema 31 estão mostradas as estruturas de todos os xMEI: 1MEI, 4(5)MEI e 2MEI.

Esquema 31. Estruturas e equilíbrio tautomérico dos xMEI



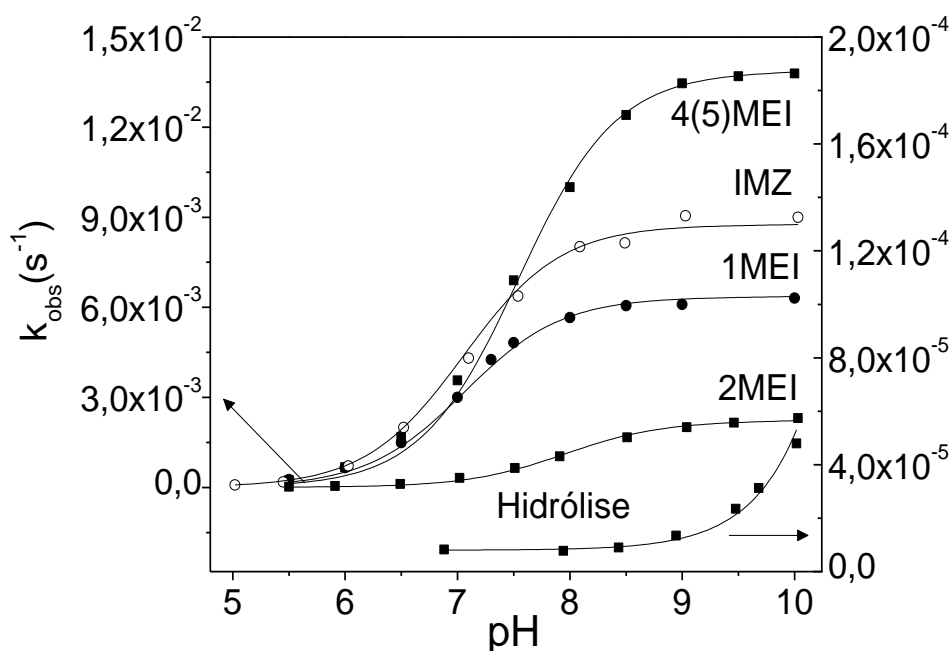
Como pode ser observado, o equilíbrio tautomérico característico do IMZ, também está presente nas estruturas dos xMEI, exceto no 1MEI, que apresenta o substituinte ligado diretamente a um dos átomos de nitrogênio, impossibilitando a transferência do próton. Cabe ressaltar que enquanto o efeito tautomérico no IMZ e 2MEI resulta num equilíbrio envolvendo duas espécies de mesma estrutura, no 4(5)MEI, há a formação de duas espécies distintas, 4MEI e 5MEI, e,

consequentemente, devem apresentar reatividades diferentes. Por essa razão, o equilíbrio tautomérico deve ser levado em consideração no estudo de sua reatividade.

4.2.1. Estudos cinéticos

Inicialmente foram realizados estudos cinéticos por espectrofotometria no UV-Vis com cada um dos xMEI, sendo constatado que todos apresentaram elevada atividade catalítica na reação de desfosforilação com DEDNPP, como mostrado no perfil cinético em função do pH apresentado na Figura 16. A típica dependência de k_{obs} com pH, na qual há maior aumento na velocidade das reações na faixa próxima do pK_{aH} do nucleófilo, foi observada, evidenciando a alta reatividade apresentada pelas espécies neutras (platô $\sim pK_{aH}$), em contraste às suas respectivas formas catiônicas. Os ajustes dos resultados experimentais, representados pelas linhas sólidas (Figura 16), foram realizados por meio da Equação 4 que inclui a contribuição da espécie neutra do xMEI, além daquelas referentes à hidrólise espontânea (k_0) e alcalina (k_{OH}) como mostrado no Esquema 32. Os parâmetros cinéticos obtidos estão apresentados na Tabela 6.

Figura 16. Perfis de pH obtidos das reações dos xMEI ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$) com DEDNPP, a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. A hidrólise espontânea do triéster (eixo da direita) e o perfil do IMZ estão mostrados para comparação.⁷ As linhas sólidas representam os ajustes com a Eq. 4.



Esquema 32. Reações do DEDNPP com os xMEI considerando todas as possíveis contribuições em k_{obs} .

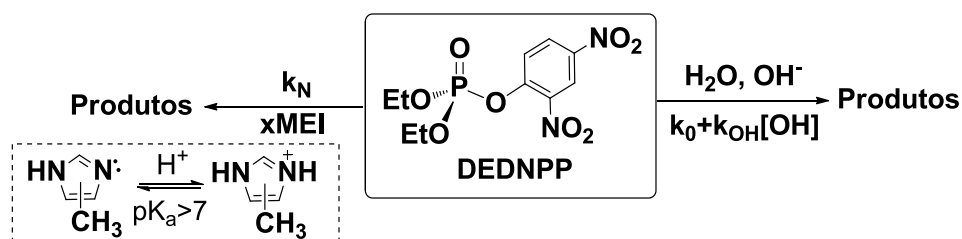


Tabela 6. Parâmetros cinéticos e termodinâmicos das reações do xMEI e IMZ com DEDNPP.

	4(5)MEI	IMZ	1MEI	2MEI
$k_0, ^{120} \text{ s}^{-1}$		$8,0(\pm 0,5) \times 10^{-6}$		
$k_{OH}, ^{120} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$		$0,25 \pm 0,02$		
$k_N, 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$27,7 \pm 0,29$	$17,7 \pm 0,21$ ¹⁸	$12,8 \pm 0,09$	$4,4 \pm 0,08$
pK_{aH}^2	7,69	6,95	7,21	7,85
$\Delta H^\ddagger^a, \text{ kcal mol}^{-1}$	$7,4 \pm 0,21$	$7,7 \pm 0,7$	$9,6(\pm 1,0)$	$9,0(\pm 0,3)$
$\Delta S^\ddagger, \text{ cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$	$-42,7 \pm 1,4$	$-42,6 \pm 0,2$	$-37,0 \pm 6,7$	$-41,2 \pm 2,0$
$\Delta G^\ddagger^a, \text{ kcal mol}^{-1}$	20,1	20,4	20,6	21,2

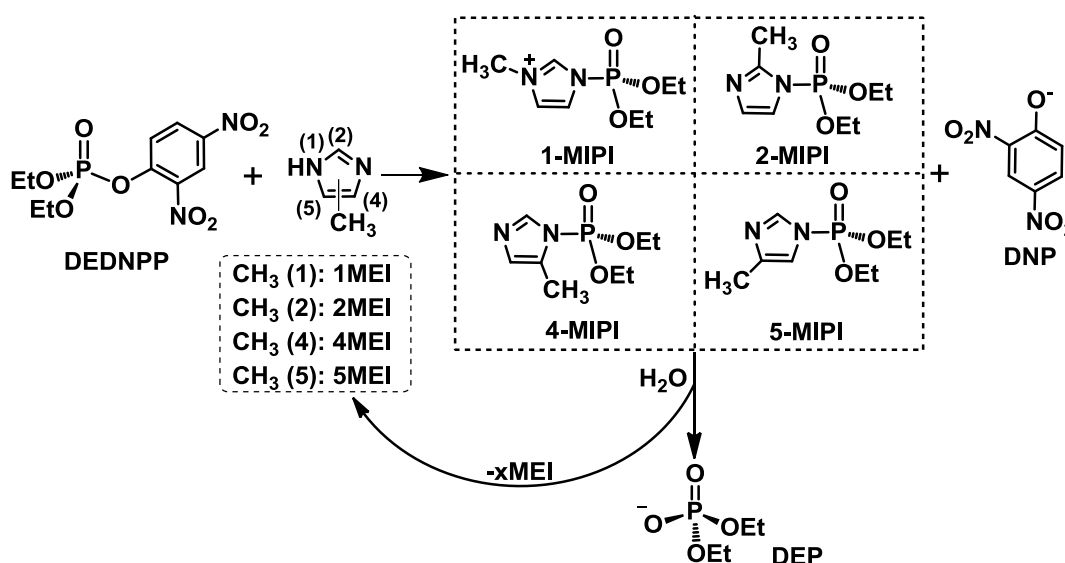
^a Calculado em pH 8,5 a 25°C.

Os resultados mostraram acentuados incrementos catalíticos de $1,9 \times 10^5$, $8,9 \times 10^4$ e $3,0 \times 10^4$ para 4(5)MEI, 1MEI e 2MEI, respectivamente, na reação com DEDNPP, em comparação com sua hidrólise espontânea. De forma geral, maiores valores de pK_{aH} são indicativos de maior nucleofilicidade,¹²⁸ porém, curiosamente, a ordem de reatividade dos xMEI não está diretamente relacionada com a sua basicidade, como mostrado na Tabela 6. Nesse sentido, apesar do maior valor de pK_{aH} , os estudos cinéticos mostraram que o 2MEI apresenta a menor reatividade em relação aos demais derivados, enquanto que o catalisador mais eficaz para a clivagem de DEDNPP foi o 4(5)MEI. Esse derivado, por sua vez, apresentou k_N 1,6, 2,2 e 6,3 vezes maior do que IMZ, 1MEI e 2MEI, respectivamente. Portanto, mediante tais resultados, estudos mais aprofundados foram necessários para esclarecer as diferenças observadas na reatividade de cada derivado.

Os parâmetros termodinâmicos foram determinados por meio de gráficos de Eyring (ver Apêndice), sendo também apresentados na Tabela 6. Com base nos

valores altamente negativos de entropias de ativação, todas as reações envolvendo xMEI apresentaram-se compatíveis com mecanismo nucleofílico bimolecular, análogo ao observado com IMZ.¹⁸ Outra evidência para a proposição mecanística foram os valores experimentais de energia livre de ativação, que se mostraram próximos daqueles relatados em estudos anteriores envolvendo reações similares. Assim, propôs-se o caminho reacional apresentado no Esquema 33, em que o par de elétrons livre do nitrogênio dos xMEI ataca o átomo de fósforo do DEDNPP, deslocando DNP, por meio de mecanismo concertado, levando à formação de intermediário fosforilado. Como já mencionado, devido à presença de fraca ligação P-N, esse intermediário, por sua vez, é facilmente hidrolisado, regenerando o catalisador e levando ao produto DEP. Cabe ressaltar que esse mecanismo envolvendo o IMZ já foi detalhadamente elucidado.¹⁸

Esquema 33. Mecanismo proposto para a reação dos xMEI com DEDNPP.



Como mencionado, todas as reações foram monitoradas por UV-Vis, tendo como evidência a formação de DNP (Esquema 33). Nesse contexto, apenas pelo estudo das bandas obtidas, não é possível distinguir, por exemplo, a reatividade de tautômeros assimétricos, como no caso do 4(5)MEI, que levam a intermediários distintos. Além disso, é de interesse investigar a formação e quebra dos fosforilimidazóis que, por apresentarem a fraca ligação P-N, são susceptíveis a hidrólise,¹¹⁶ sendo esse processo diretamente ligado à regeneração do catalisador. Assim, visando avaliar as reações em maiores detalhes, as reações dos xMEI foram submetidas a análises por RMN e cálculos teóricos, como apresentado a seguir.

4.2.2. Elucidação mecanística por ressonância magnética nuclear

Para melhor compreensão dos mecanismos da reação dos xMEI com DEDNPP, foram realizadas análises por espectroscopia de RMN. O estudo detalhado dos espectros em 1D e mapas de correlação em 2D levou à atribuição dos deslocamentos químicos de ^1H , ^{13}C , e ^{31}P (Tabela 7) e, portanto, à caracterização das espécies envolvidas, com resultados consistentes com o mecanismo proposto no Esquema 33. Além disso, os resultados estão em concordância com dados publicados em trabalho anterior, referentes à reação do IMZ com DEDNPP, em que foi observada a formação do intermediário fosforilado.

Tabela 7. Dados referentes às espécies detectadas nas reações dos xMEI com DEDNPP em pH 8,5^a a 25 °C, por RMN (600 MHz, H₂O/D₂O).^b

Espécie	δ_{H}	δ_{P}
1MEI	7,09 (s, 1H, Ar), 7,18 (s, 1H, Ar), 3,79 (s, 3H, CH ₃)	
2MEI	7,09 (s, 2H, Ar), 2,45 (s, 3H, CH ₃)	
4(5)MEI	7,80 (s, 1H, Ar), 6,87 (s, 1H, Ar) e 2,23 (s, 3H, CH ₃)	
DEDNPP	8,99 (dd, 1H, Ar), 8,63 (dd, 1H, Ar), 7,80 (dd, 1H, Ar), 4,38 (dq, 4H, CH ₂), 1,39 (td, 6H, CH ₃)	-7,5
2-MIPI	7,32 (d, 1H, Ar), 7,02 (d, 1H, Ar), 4,27 (dq, 4H, CH ₂), 2,53 (s, 3H, CH ₃), 1,35 (td, 6H, CH ₃)	-4,9
4-MIPI	7,83 (Ar), 6,88 (Ar), 4,25 (dq, 4H, CH ₂), 2,33 (d, 3H, CH ₃), 1,33 (td, 6H, CH ₃)	-5,2
5-MIPI	7,91 (s, 1H, Ar), 7,05 (q, 1H, Ar), 4,22 (dq, 4H, CH ₂), 2,20 (d, 3H, CH ₃), 1,32 (td, 6H, CH ₃)	-5,6
DNP	8,85 (dd, 1H, Ar), 8,09 (dd, 1H, Ar), 6,74 (dd, 1H, Ar)	
DEP	3,92 (dq, 4H, CH ₂), 1,25 (td, 6H, CH ₃)	0,8

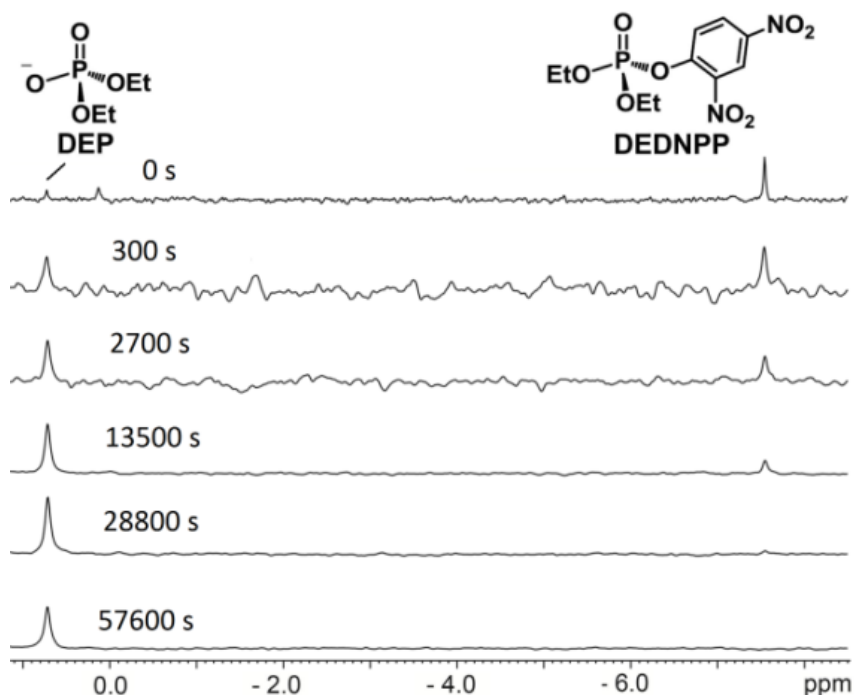
^a 46% acetonitrila e 10% D₂O. ^b Tabela completa no Apêndice.

O RMN de ^{31}P obtido da solução de DEDNPP antes da reação com os derivados xMEI apresentou sinais em -7,5 e 0,7 ppm, sendo o primeiro atribuído ao DEDNPP por meio de experimentos de correlação de ^1H - ^{13}C e ^1H - ^{31}P de uma ligação e de longa distância. Os hidrogênios aromáticos do triéster em 8,98 (1H), 8,64 (1H) e 7,81 (1H) ppm, bem como aqueles dos grupos etoxila 4,39 (4H) e 1,39 (6H) ppm mostraram correlação ^1H - ^{31}P de longa distância correlação com o fósforo

em -7,5 ppm (Tabela 7). O sinal em 0,7 ppm foi associado ao produto DEP, resultante da hidrólise espontânea do triéster, já que este apresentou correlação de ^1H - ^{31}P de longa distância apenas com os hidrogênios dos grupos etoxi observados no espectro de RMN de ^1H a 3,93 (4H) e 1,26 (6H) ppm (ver Apêndice).

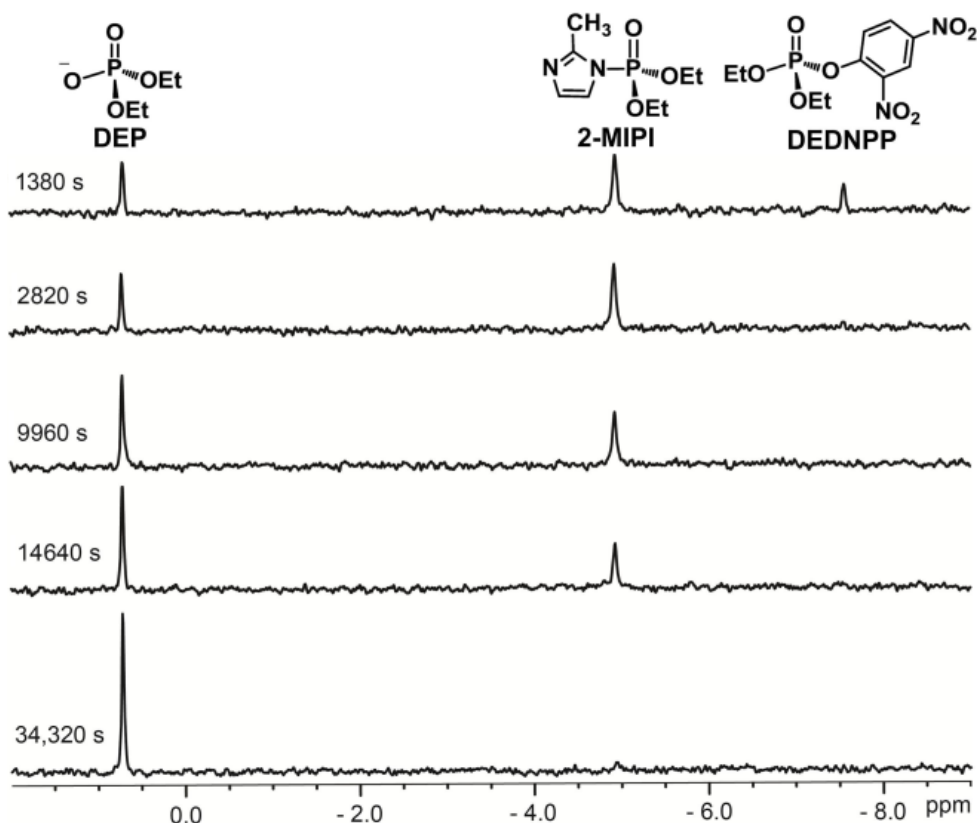
Avaliou-se, então, a reação do DEDNPP com 1MEI por meio dos espectros sucessivos de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ (Figura 17). Durante o progresso da reação, foi observada a diminuição do sinal do DEDNPP em -7,5 ppm até 480 min, com simultâneo aumento do sinal DEP em 0,7 ppm. De fato, nenhum outro sinal foi observado nos espectros de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ e ^1H , indicando uma alta instabilidade do intermediário fosforilado derivado do 1MEI (1-MIPI) frente à hidrólise. Como será discutido na sequência, esse comportamento era esperado, visto que a metila ligada ao nitrogênio elimina a possibilidade de perda do próton, em contraste aos outros xMEI. Ainda, com o progresso da reação, foi possível confirmar o produto DNP (Esquema 33, Tabela 7) nos espectros de ^1H (ver Apêndice), além dos sinais do 1MEI que não apresentaram qualquer correlação de ^1H - ^{31}P de longa distância.

Figura 17. Espectros sucessivos de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ obtidos da reação do 1MEI ($0,04 \text{ mol L}^{-1}$) com DEDNPP ($7,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em pH 8,5 a $25 \text{ }^\circ\text{C}$.



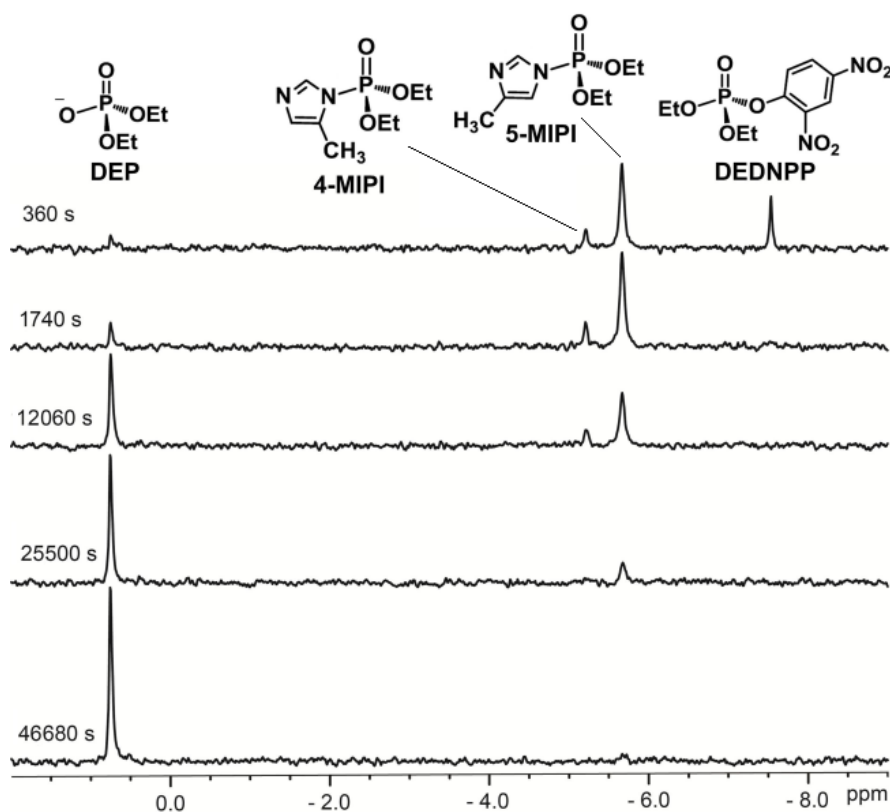
Para reação do DEDNPP com o derivado 2MEI, os espectros de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$, obtidos apresentaram os típicos sinais do DEDNPP e DEP e o aparecimento de um sinal adicional em -4,9 ppm (Figura 18). Além disso, outros sinais característicos de grupos etoxila (4,27 e 1,35 ppm) foram observados no espectro de RMN de ^1H (distintos do DEDNPP e DEP), que mostraram correlação ^1H - ^{31}P de longa distância com a mesma espécie de fósforo a -4,9 ppm. Assim, atribuiu-se esses sinais ao intermediário fosforilado 2-MIPI (Esquema 33). Os espectros de RMN de ^1H apresentaram os sinais referentes ao 2MEI e DNP (Tabela 7). No caso da reação com 2MEI (Figura 18), os espectros sucessivos de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ mostram um comportamento similar àquele observado no caso do 1MEI, com diminuição do sinal do DEDNPP em -7,5 ppm e simultâneo aumento do sinal do DEP em 0,8 ppm. Ainda, o intermediário fosforilado 2MIPI (-4,9 ppm) aumentou durante os 50 s iniciais de reação, diminuindo posteriormente pela ocorrência de reação de hidrólise.

Figura 18. Espectros sucessivos de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ obtidos da reação do 2MEI ($0,3 \text{ mol L}^{-1}$) com DEDNPP ($7,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em pH 8,5 a $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

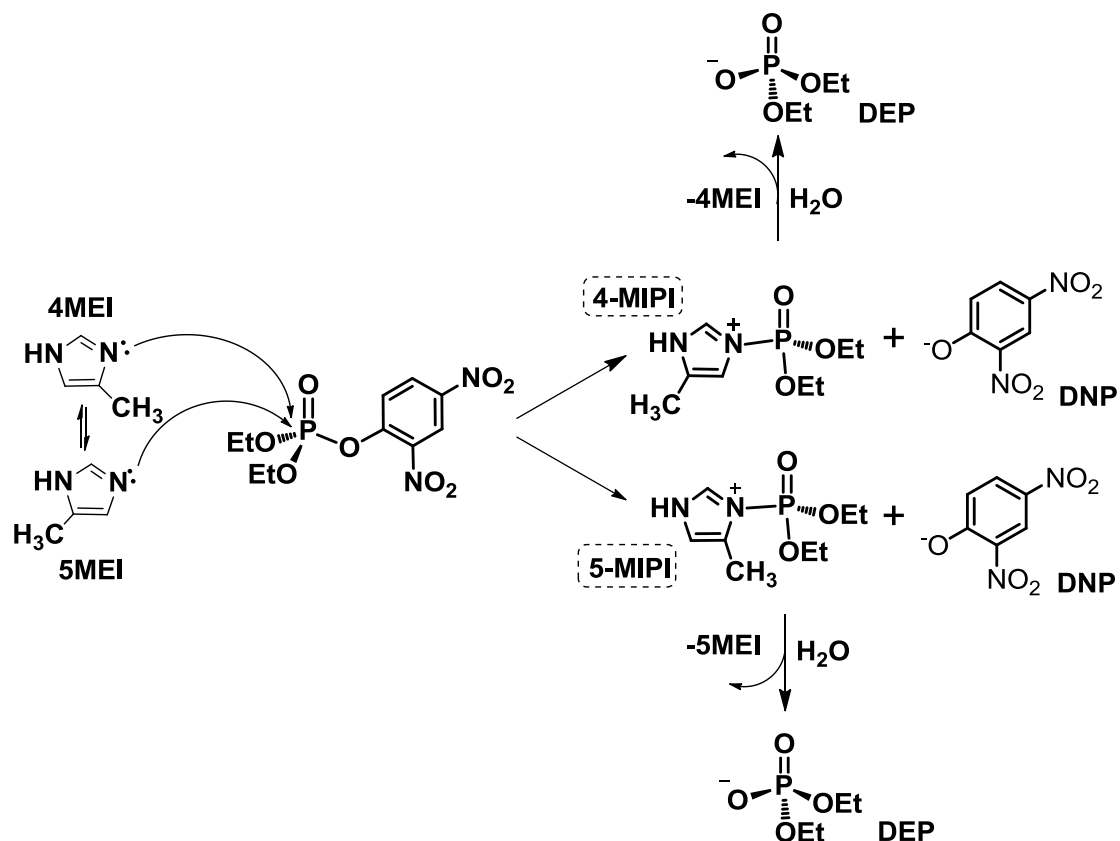


As espécies envolvidas na reação de desfosforilação mediada pelo derivado 4(5)MEI também foram submetidas à análise de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$. Os espectros mostraram dois novos sinais em -5,2 e -5,6 ppm, além daqueles referentes ao DEDNPP e DEP (Figura 19 e Tabela 7). Essa evidência indicou a presença de dois intermediários fosforilados com formação atribuída às reações competitivas entre os tautômeros 4MEI e 5MEI com DEDNPP, como reiterado pelos mecanismos mostrados no Esquema 34. De fato, o espectro de RMN de ^1H mostrou dois conjuntos de sinais distintos. O primeiro, formado pelos sinais referentes ao anel de IMZ (7,91, 7,05 e 2,20 ppm) e grupos etoxila (4,22 e 1,32 ppm), mostraram RMN de correlação ^1H - ^{31}P de longa distância com a espécie em -5,6 ppm. Por sua vez, o segundo conjunto de sinais característico do grupo IMZ (7,83, 6,88, e 2,33) e grupos etoxi (4,25 e 1,33 ppm), apresentou correlação ^1H - ^{31}P de longa distância com a espécie em -5,2 ppm. Essas observações confirmam a presença dos intermediários 4-MIPI e 5-MIPI, resultantes das diferentes reatividades dos tautômeros 4MEI e 5MEI. Cabe ressaltar que os sinais atribuídos ao DNP e 4(5)MEI também foram observados no espectro de RMN de ^1H .

Figura 19. Espectros sucessivos de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ obtidos da reação do 4(5)MEI ($0,3 \text{ mol L}^{-1}$) com DEDNPP ($7,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em pH 8,5 a $25 \text{ }^\circ\text{C}$.



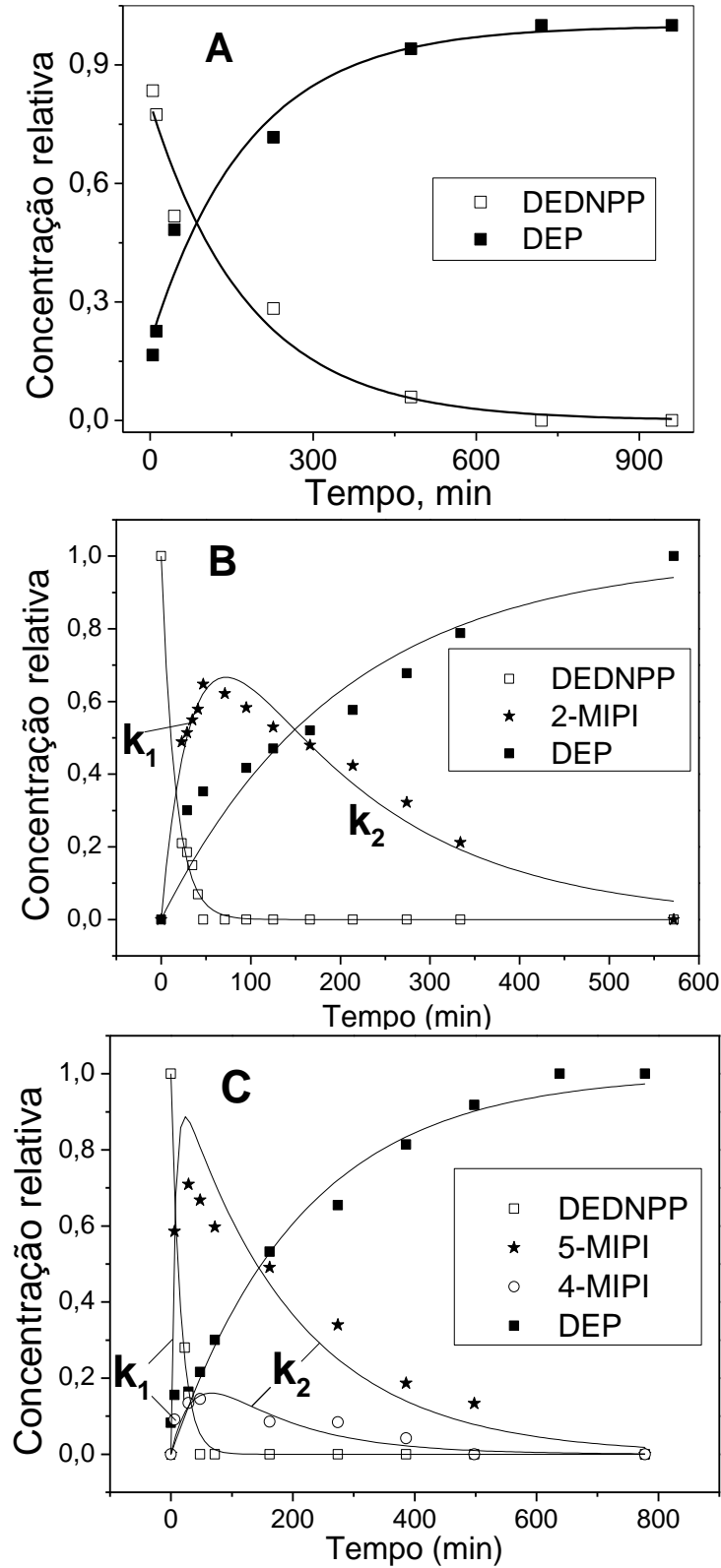
Esquema 34. Mecanismo da reação dos tautômeros do 4(5) MEI com DEDNPP.



Conforme esperado, espectros consecutivos de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ com 4(5)MEI evidenciaram o consumo de DEDNPP com concomitante formação de DEP. Ainda, foi possível monitorar a formação e a hidrólise dos intermediários fosforilados advindos dos distintos tautômeros com sinais -5,2 e -5,6 ppm, referentes respectivamente às espécies 4MIPI e 5-MIPI, sendo que o último apresenta maior estabilidade (tempo de vida). A detecção e monitoramento das espécies formadas a partir de equilíbrio tautomérico constituíram importante contribuição para a compreensão da reatividade de derivados de IMZ, sendo que ainda não havia sido reportado na literatura.

Buscando uma compreensão ainda mais detalhada acerca da reação do DEDNPP pelos xMEI, principalmente com relação à reatividade dos intermediários, perfis cinéticos de concentração relativa para cada espécie em função do tempo (Figura 20) foram obtidos a partir das integrais dos sinais de RMN de ^{31}P .

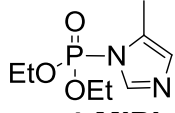
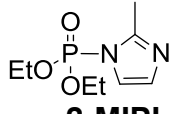
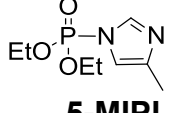
Figura 20. Perfis de concentração relativa em função do tempo referentes às espécies detectadas nas reações do (A) 1MEI, (B) 2MEI, (C) 4(5)MEI com DEDNPP por RMN de ^{31}P .



As curvas contendo os dados experimentais de concentração relativa dos intermediários fosforilados (x-MIPI) foram ajustadas mediante aplicação da Equação 16, referente à cinética de reações consecutivas de primeira ordem,^{7,87} permitindo, assim, calcular as constantes de velocidade para cada etapa do processo. Os resultados estão resumidos na Tabela 8, com k_1 correspondente à constante de velocidade de segunda ordem referente à formação do intermediário e k_2 é relativa à sua hidrólise. Como o intermediário 1-MIPI não foi detectado por RMN, os parâmetros cinéticos foram obtidos com base no consumo de DEDNPP (Figura 20A). Cabe ressaltar que, mesmo assim, o resultado mostrou-se compatível com aquele apresentado no estudo cinético por UV-Vis, corroborando ao mecanismo proposto no Esquema 33.

$$[x - \text{MIPI}] = \frac{k_1}{k_2 - k_1} (e^{-k_1 t} - e^{-k_2 t}) \quad (16)$$

Tabela 8. Parâmetros cinéticos referentes aos intermediários formados reações do 2MEI e 4(5)MEI com DEDNPP, obtidos pelos perfis mostrados na Figura 20. Os erros estão dados entre parênteses.

Intermediário	$k_1, \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	k_2, s^{-1}	$t_{1/2} (\text{s})$
 4-MIPI	$(15,2 \times 10^{-3} \pm 2,58) \times 10^{-3}$	$(6,33 \pm 1,11) \times 10^{-4}$	1500
 2-MIPI	$(8,17 \pm 0,41) \times 10^{-3}$	$(9,35 \pm 0,48) \times 10^{-5}$	7380
 5-MIPI	$0,47 \pm 0,127$	$(8,63 \pm 1,25) \times 10^{-5}$	7980

A partir dos parâmetros cinéticos dos intermediários apresentados na Tabela 8, observou-se que a tendência de reatividade dos nucleófilos está de acordo com o estudo cinético por UV-Vis, mostrado na sessão anterior, ou seja, 4(5)MEI > 2MEI. Resultados mostraram ainda que, dentre os tautômeros do 4(5)MEI, o 5MEI apresentou reatividade 31 vezes maior que seu par 4MEI, sendo esse comportamento independente da população dos tautômeros em solução. De fato,

em estudo teórico anterior foi mostrado que o nucleófilo menos reativo, 4MEI, apresenta maior proporção no equilíbrio tautomérico, sendo correspondente a 60%.¹²⁹ Portanto, a diferença de reatividade não está atrelada à concentração relativa de cada tautômero, mas sim às suas distinções estruturais. Essa evidência sugere que a reação respeite o esquema reacional proposto por Curtin-Hammett, situação em que duas reações competem devido a interconversão de dois reagentes, sendo a população dos diferentes produtos determinada pela energia de ativação de cada caminho.⁸⁸ Cabe mencionar ainda que a espécie 4MEI mostrou nucleofilicidade apenas ligeiramente mais elevada do que 2MEI (Tabela 8), que por sua vez apresentou a menor atividade catalítica.

A estabilidade relativa dos MIPI frente à hidrólise (k_2 da Tabela 8) pode estar relacionada com a basicidade do grupo abandonador. Diferentemente do 2MEI, o pK_{aH} do 4(5)MEI protonado (7,69)² é uma média da contribuição dos dois diferentes tautômeros e, portanto, uma análise baseada simplesmente por comparações diretas não é possível. Nesse contexto, a afinidade protônica é uma aproximação razoável para estimar a basicidade de um composto, visto que corresponde à energia liberada com a protonação de uma molécula neutra ou íon, calculada em fase gasosa. De fato, esse valor é 0,6 kcal mol⁻¹ maior para o 5MEI comparado ao 4MEI.¹³⁰ Assim, 4MEI deve ser melhor grupo abandonador do que o 5MEI por apresentar menor basicidade e, mesmo se tratando de uma diferença pequena, a relação está de acordo com o curto tempo de vida do 4-MIPI em relação ao 5-MIPI.

A inclusão de técnicas de RMN no estudo das reações propostas teve fundamental importância para confirmação do mecanismo nucleofílico proposto (Esquemas 33 e 34), complementando, assim, os resultados do estudo cinético por UV-Vis. Além disso, foi possível discernir a reatividade do par tautomérico 4MEI-5MEI, o que é interessante sob o ponto de vista mecanístico e estrutural. No entanto, a fim de compreender claramente a influência da posição do metil em derivados IMZ, bem como obter ainda mais detalhes dos mecanismos de reação, cálculos DFT foram realizados.

4.2.3. Compreendendo o efeito do posicionamento da metila por cálculos teóricos

Os resultados obtidos com os estudos cinéticos por UV-Vis e RMN mostraram que o grupo metila, na maioria das possíveis posições do anel de IMZ, atua diminuindo sua nucleofilicidade, em relação ao IMZ não substituído, em reação com DEDNPP. No entanto, na ausência de efeitos estéricos, seria razoável considerar que um grupo alquila tenderia a aumentar a nucleofilicidade de uma molécula, devido à hiperconjugação. O derivado 2MEI mostrou-se menos reativo que o IMZ, 1MEI e 4(5)MEI frente ao DEDNPP, indicando que o efeito estérico causado pela metila, quando posicionada em carbono alfa ao nitrogênio nucleofílico, inibe o ataque ao fósforo. Como já mencionado, em contraste ao 1MEI, o 2MEI e o 4(5)MEI apresentam tautomerismo em solução aquosa, porém, como mostrado por RMN, esse último ocorre como um par de moléculas de reatividades diferentes. Devido ao efeito estérico semelhante, o 4MEI apresentou baixa atividade catalítica, similar àquela observada ao 2MEI, enquanto seu tautômero 5MEI mostrou o mais elevado poder catalítico na clivagem do DEDNPP. Assim, o 5MEI é o responsável pela alta eficiência do derivado 4(5)MEI, em reações de desfosforilação, e cálculos DFT foram realizados para explorar esses e outros possíveis efeitos associados à sequência de reatividade apresentada experimentalmente. Devido ao interesse principal ser referente à compreensão da reatividade dos derivados de IMZ, cálculos foram realizados apenas para a primeira etapa de reação, referente ao ataque nucleofílico.

Os funcionais M06-2X e B3LYP combinados com as funções de base 6-31+G(d,p) e 6-311++G(d,p) incluindo solvatação implícita pelo método *smd* foram utilizados para avaliar qual método/base apresentaria valores de ΔG^\ddagger de acordo com resultados obtidos experimentalmente. Inesperadamente, o método B3LYP combinado como o menor conjunto de base reproduziu corretamente a ordem de reatividade 5MEI>IMZ>1MEI>4MEI~2MEI, apesar das barreiras terem sido levemente superestimadas, como mostrado na Figura 21. Ao utilizar 6-311++G(d,p) houve inversão das barreiras reacionais do IMZ com a do 1MEI e os cálculos realizados com o funcional M06-2X utilizando ambos conjuntos de base, mostraram erroneamente IMZ e 2MEI como os nucleófilos de maior eficácia, mesmo com critério de convergência mais restrito (*int=ultrafine*). Assim, todos os cálculos foram realizados com o método B3LYP/6-31+G(d,p), sendo os ETs obtidos referentes às

reações do IMZ e xMEI com DEDNPP mostrados na Figura 21 e as barreiras de ativação apresentados na Tabela 9 e Figura 22.

Figura 21. Barreiras experimentais e calculadas (ΔG^\ddagger (kcal mol⁻¹)) para as reações dos xMEI e IMZ com DEDNPP e estruturas dos ETs obtidas utilizando o método B3LYP/6-31G+(d,p).

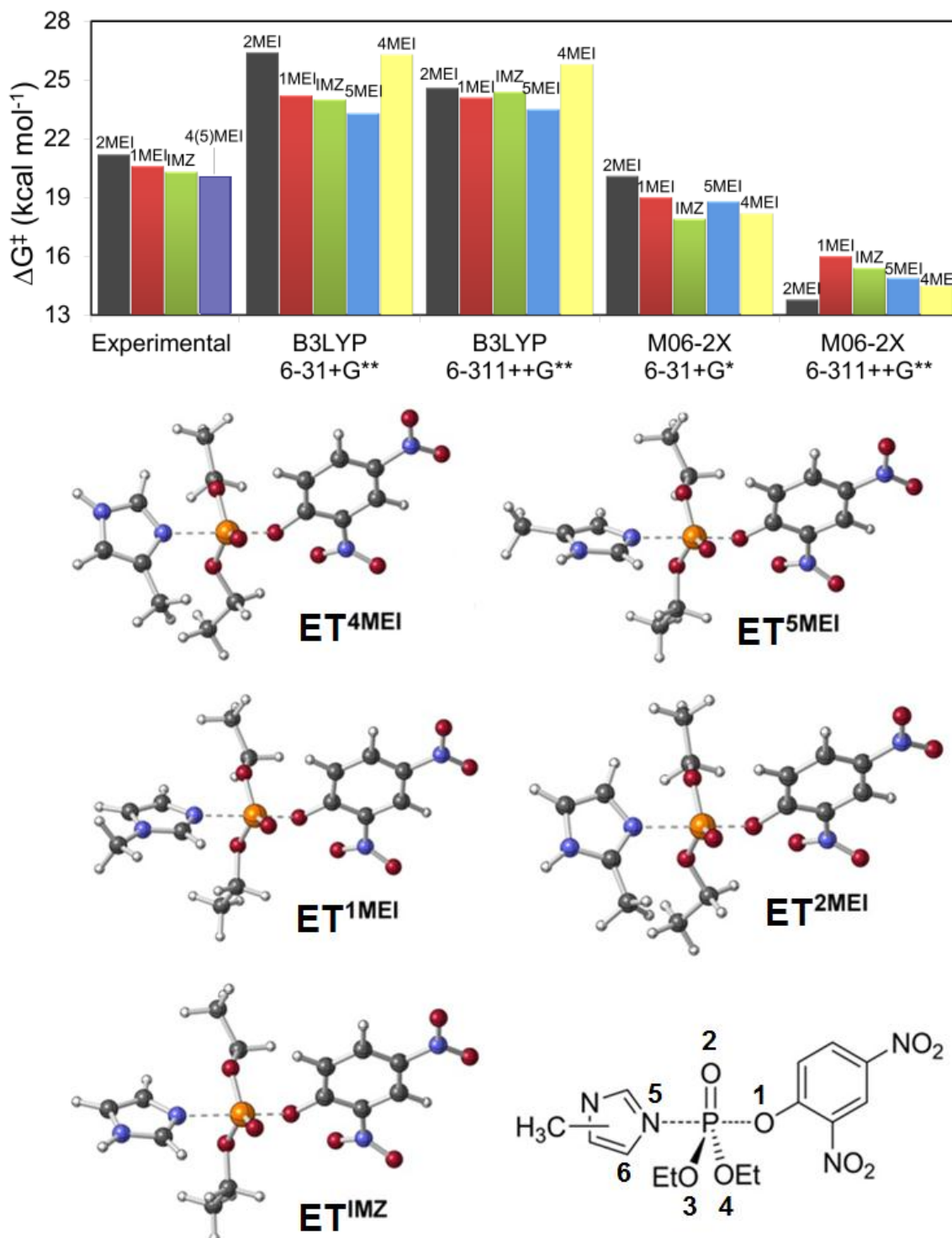
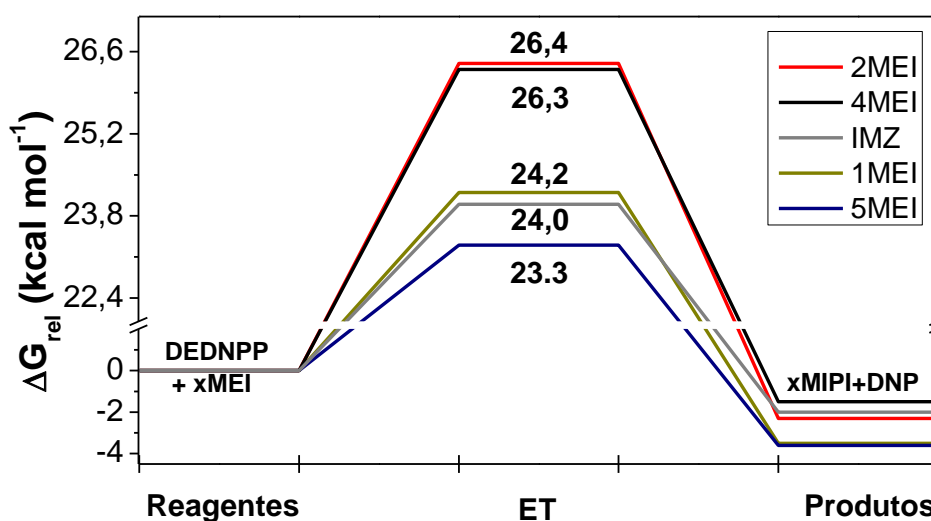


Tabela 9. Barreiras de ativação ($\Delta G^\ddagger/\text{kcal mol}^{-1}$) experimentais e teóricas referentes às reações dos xMEI e IMZ com DEDNPP.

Espécie	ΔG^\ddagger	ΔG^\ddagger
	(kcal mol^{-1}) Experimental ^a	(kcal mol^{-1}) B3LYP/6-31+G(d,p)
2MEI	21,3	26,4
1MEI	20,6	24,2
IMZ	20,4	24
5MEI	20,1 ^b	23,3
4MEI		26,3

^a xMEI a 0,5 mol L⁻¹, pH 8,5, 25°C. ^b contribuição de ambos os tautômeros.

Figura 22. Diagrama de energia da coordenada da reação determinado com o método B3LYP/6-31+G(d,p).



Os parâmetros geométricos mais relevantes provenientes das espécies calculadas estão apresentados na Tabela 10. Ainda que a maioria dos valores mostraram-se similares nas diferentes reações avaliadas, o ângulo diedro C6-N5-P-O2 (Figura 21) teve consideráveis mudanças, sendo possível, inclusive, relacioná-lo às barreiras reacionais. De fato, para os ET referentes aos nucleófilos menos

reativos, 2MEI e 4MEI, esse ângulo resultou próximo de -57° , enquanto valores entre -12 e -21° foram encontrados para IMZ, 1MEI e 5MEI. Os resultados são consistentes com existência de impedimento estérico da metila do 2MEI e 4MEI com átomo de oxigênio (O2) durante o ataque nucleofílico ao fósforo, e a rotação minimiza esse efeito (Figura 21).

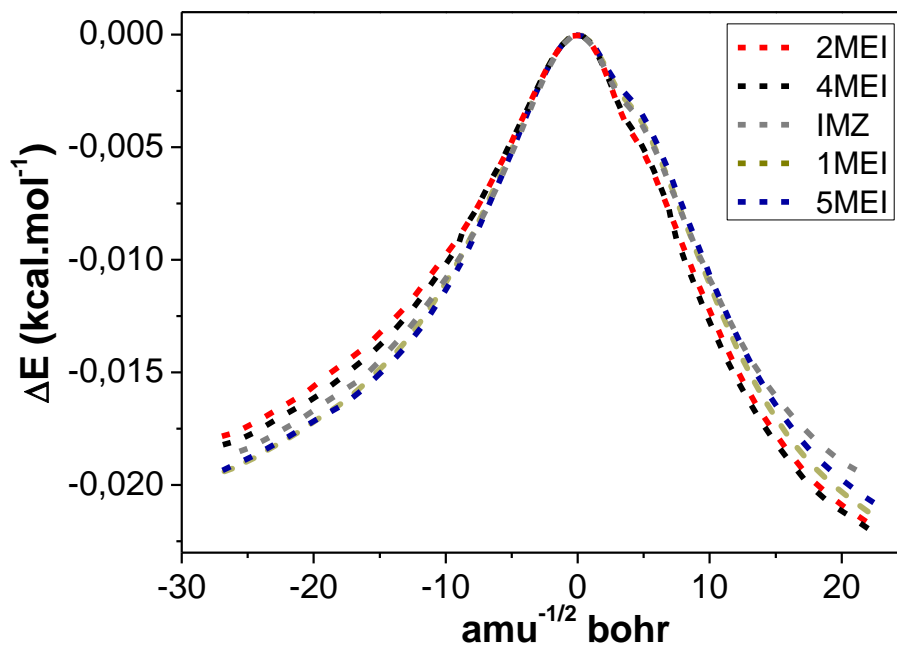
Tabela 10. Parâmetros geométricos das espécies envolvidas na reação dos xMEI e IMZ com DEDNPP obtidos com o método B3LYP/6-31+G(d,p).^a

Espécie	N5-P (Å)	P-O1 (Å)	C6-N5-P-O2 (°)	H(C7)- O2 (Å)
ET ^{2MEI}	2,273	1,783	-56,75	-
ET ^{4MEI}	2,260	1,787	-56,88	4,096
ET ^{IMZ}	2,274	1,783	-21,13	2,734
ET ^{1MEI}	2,274	1,782	-17,88	2,757
ET ^{5MEI}	2,285	1,780	-12,10	2,737
2-MIPI	1,754	-	37,70	-
4-MIPI	1,757	-	40,59	4,302
IPI ^b	1,755	-	15,67	2,747
1-MIPI	1,750	-	18,06	2,765
5-MIPI	1,752	-	13,39	2,725

^a Como indicado na Figura 21. ^b Intermediário fosforilado formado pelo IMZ.

Para obtenção de mais detalhes da energia em cada etapa do processo de substituição nucleofílica, foram realizados cálculos IRC. Como pode ser observado na Figura 23, os gráficos mostram que a formação da ligação N5-P e a clivagem da ligação P-O1, em todas as reações, ocorrem via mecanismo concertado, além de apresentarem acentuado sincronismo ao longo da coordenada da reação.

Figura 23. Gráficos da IRC referente às reações dos xMEI e IMZ com DEDNPP, calculados com método B3LYP/6-31+G(d,p).



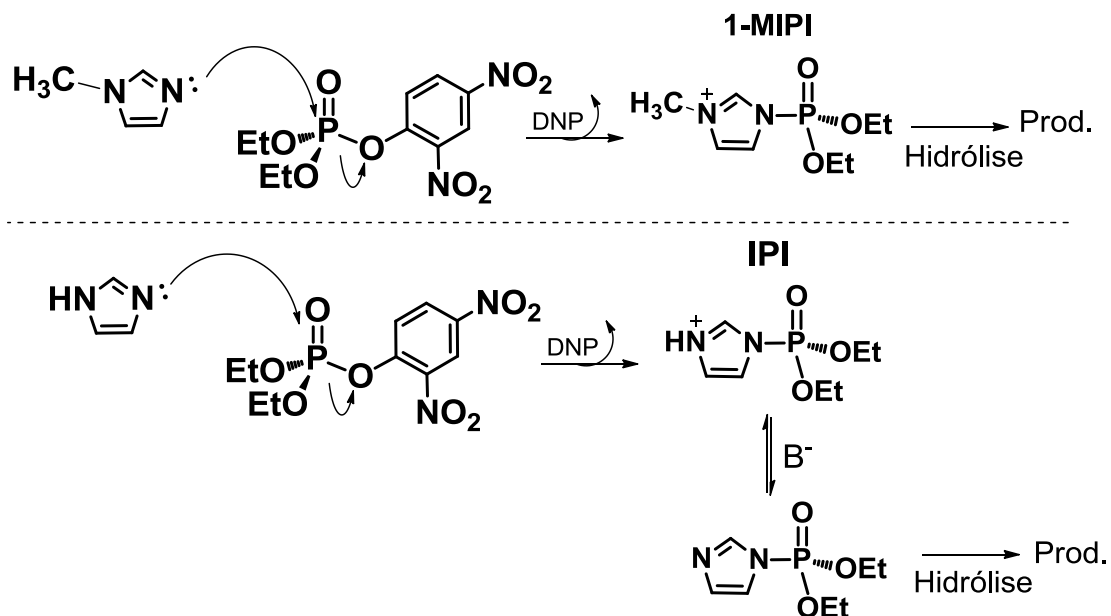
Como as espécies mais reativas 1MEI, IMZ e 5MEI não apresentam efeito estérico significativo durante o ataque nucleofílico ao fósforo do DEDNPP, outros fatores foram necessários para explicar as suas diferentes reatividades. Nesse sentido, análise com base nas energias dos orbitais que contém o par não ligante do nitrogênio (σ_{NLN}) foi realizada, com o objetivo de avaliar se há alguma dependência entre a reatividade e a contribuição eletrônica. Cálculos em nível B3LYP/6-31+G(d,p), mesmo método utilizado para discussão das barreiras reacionais, mostraram que 5MEI e 2MEI possuem σ_{NLN} de maior energia, ou seja, indicando maior reatividade, enquanto os menos energéticos foram observados no IMZ e 1MEI (Tabela 11). No entanto, mesmo com σ_{NLN} mais reativo comparado ao demais, o efeito estérico apresentado pelo 2MEI é preponderante e governa a velocidade da reação. O mesmo vale ao comparar a energia do σ_{NLN} presente no 4MEI, com aquelas observadas para o IMZ e 1MEI.

Tabela 11. Energias do orbital sigma contendo o par de elétrons não ligante do nitrogênio (σ_{NLN}) de cada nucleófilos.

Espécie	IMZ	1MEI	4MEI	5MEI	2MEI
$E^{\text{HOMO}}^{\text{[a]}}$ (Hartrees)	-0,2895	-0,2864	-0,2857	-0,2853	-0,2847

^[a] B3LYP/6-31+G(d,p).

Na análise da energia do orbital σ_{NLN} especificamente para o caso dos três nucleófilos que não apresentam efeito estérico, *i.e.* 1MEI, 5MEI e IMZ, apesar das diferenças terem sido discretas, os resultados são consistentes com a maior reatividade do 5MEI comparado ao 1MEI e IMZ na clivagem do DEDNPP. Cabe ressaltar, porém, que essa mesma análise não vale ao comparar o 1MEI com IMZ, visto que o primeiro apresenta menor nucleofilicidade e σ_{NLN} mais reativo. De fato, a origem da menor reatividade apresentada pelo 1MEI em relação ao IMZ não envolve uma análise direta, uma vez que apresentam semelhantes valores de pK_{aH} , além de ausência de efeito estérico. Embora a diferença nas barreiras de ativação seja discreta (0,2 kcal mol⁻¹), esse comportamento é recorrente na literatura.^{20,131} Uma hipótese razoável para as reatividades sutilmente distintas com o DEDNPP recai na ausência do hidrogênio ligado ao nitrogênio no 1MEI, como também sugerido em estudo envolvendo reações de acilação com derivados IMZ.¹⁹ Como ilustrado no Esquema 35, após o ataque nucleofílico do IMZ ao fósforo do DEDNPP, ocorre a formação de um intermediário catiônico fosforilado, porém a carga positiva é prontamente neutralizada pela perda de um próton, reação que não é possível para o intermediário envolvendo 1MEI (1-MIPI). Isso está de acordo com os presentes resultados, já que o 1-MIPI foi o único intermediário que não pôde ser detectado por RMN, indicando menor estabilidade em relação aos outros intermediários xMIPI e IPI. Conseqüentemente, o 1MEI apresenta menor reatividade, que pode ter relação com um ataque nucleofílico sutilmente reversível pela ausência da reação de desprotonação como no caso do IMZ, mas não a ponto de torná-lo pior nucleófilo que, por exemplo, o 2MEI.



Esquema 35. Mecanismos de reação do 1MEI e IMZ com DEDNPP, com destaque para a etapa de desprotonação do IPI, ausente no 1-MIPI.

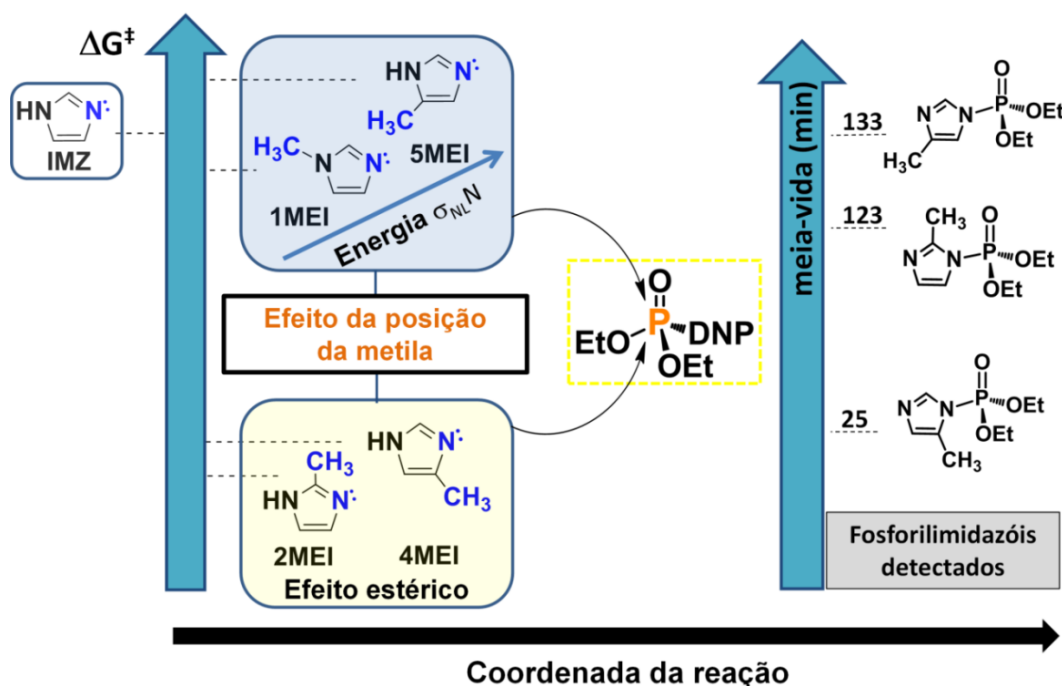
Assim, por meio de cálculos DFT, foi possível reafirmar a ordem de reatividade observada pelas técnicas experimentais, além de elucidar detalhadamente o mecanismo envolvido na formação dos intermediários. A aplicação das metodologias teóricas permitiram também revelar que o mecanismo nucleofílico apresenta elevado sincronismo em todos os xMEI e que efeitos estéricos e eletrônicos são os fatores responsáveis pela reatividade dos nucleófilos, sendo que a nucleofilicidade se mostrou independente da basicidade.

4.2.4. Conclusões Parciais

Em comparação à hidrólise espontânea de DEDNPP, todos os xMEI apresentaram elevados incrementos catalíticos ($>3 \times 10^4$ vezes) na clivagem do triéster, conforme determinado por perfis cinéticos de pH. Foi observada a seguinte ordem de reatividade: 4(5)MEI > IMZ > 1MEI > 2MEI, não sendo dependente da basicidade dos nucleófilos, visto os valores de pK_a respeitam a ordem 2MEI > 4(5)MEI > 1MEI > IMZ. O mecanismo de reação proposto foi ratificado por análises de RMN, consistindo no ataque nucleofílico do par eletrônico não ligante do nitrogênio do IMZ ao átomo de fósforo do DEDNPP, deslocando DNP.

Surpreendentemente, a reatividade dos dois tautômeros do 4(5)MEI foi distinguida por RMN de ^{31}P , sendo o 5MEI a espécie que apresentou a maior nucleofilicidade nesse equilíbrio. A Figura 24 apresenta um resumo da influência da metila na reatividade dos xMEI e na estabilidade dos intermediários fosforilado. Na parte inferior da Figura estão situados 4MEI e 2MEI, espécies que apresentam a menor reatividade devido ao impedimento estérico causado pelo substituinte, enquanto na parte superior encontra-se a espécie de maior reatividade, o 5MEI, que pode ser atribuída ao orbital σ_{NLN} de maior energia em relação ao 1MEI. Portanto, o efeito da metila é considerado antagônico nos xMEI, uma vez que este grupo é doador eletrônico, porém atua diminuindo a reatividade do IMZ, exceto quando presente na posição 5.

Figura 24. Resumo dos resultados referentes ao posicionamento da metila e sua relação com a reatividade dos xMEI na reação com o DEDNPP.

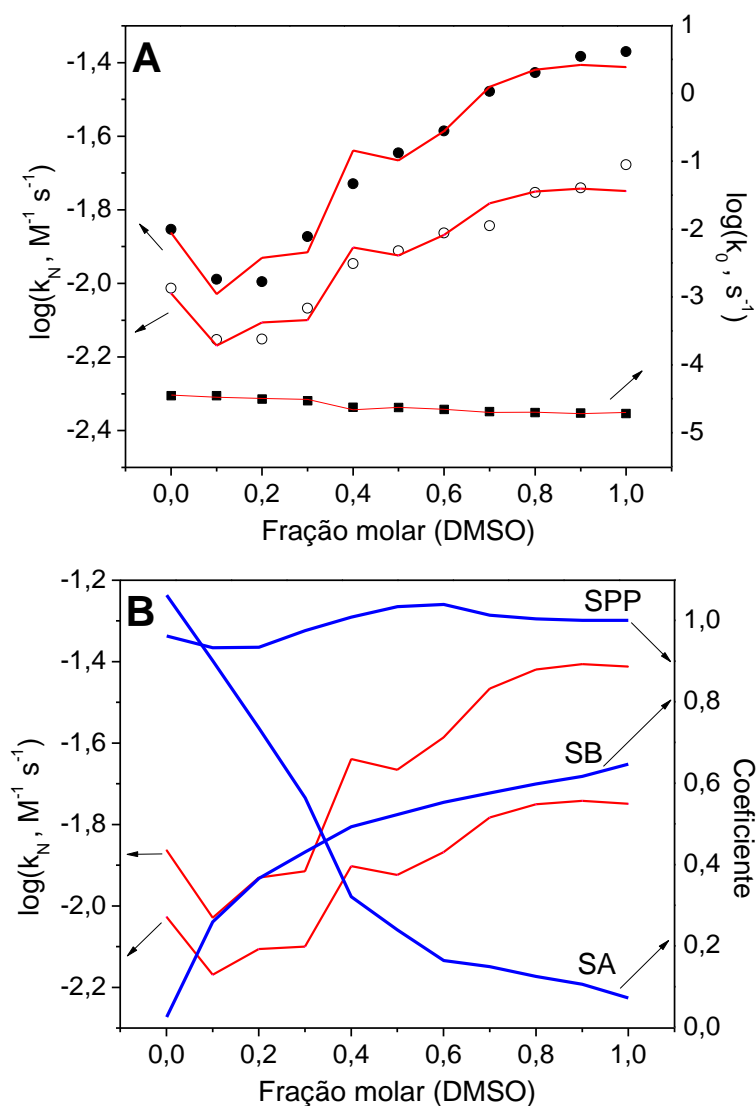


4.3. O efeito do solvente na reatividade do imidazol e 1-metilimidazol

Como apresentado nas sessões anteriores, maiores valores de pK_{aH} não necessariamente implicam em maior reatividade, no caso de derivados de IMZ, frente a clivagem do DEDNPP. De fato, o IMZ, que apresenta menor pK_{aH} , é ligeiramente mais reativo que 1MEI em solução aquosa (barreira $0,2 \text{ kcal mol}^{-1}$ menor), mesmo ambos apresentando energias do σ_{NLN} próximas e insignificante impedimento estérico no nitrogênio nucleofílico. Logo, a reatividade desses semelhantes nucleófilos foi explorada em diferentes meios reacionais, visando investigar a importância das interações soluto-solvente na atividade catalítica de clivagem do DEDNPP. Cabe ressaltar que muitos fármacos derivados de IMZ são solubilizados significativamente apenas em presença de solventes orgânicos, e, portanto, para investigar a reatividade real desses compostos, uma análise detalhada da influência do meio na sua reatividade torna-se importante.

Para o estudo, foram escolhidas diferentes composições da mistura binária DMSO/H₂O e, inicialmente, foram obtidas as constantes de pseudo-primeira ordem (k_{obs}) da reação de clivagem do DEDNPP por 1MEI e IMZ em cada composição (considerando intervalos de 10% na fração molar de cada solvente), com resultados apresentados na Figura 25A. Para relacionar os dados cinéticos obtidos com a composição do meio e, conseqüentemente, obter uma análise quantitativa do efeito do solvente nas reações de interesse, foi utilizada a escala de Catalán.¹³² Essa escala descreve uma dada mistura binária de solventes (ou um solvente puro) utilizando três parâmetros específicos, determinados em cada composição, sendo a acidez (SA) e basicidade (SB), referentes a capacidade de doação e recebimento de ligação de hidrogênio pelo meio, respectivamente. O terceiro termo, a polaridade/polarizabilidade (SPP), tem relação com a tendência de formação de outras interações dipolares, sendo mais pronunciada em solventes polares. Os valores dos parâmetros SA, SB e SPP para misturas DMSO/H₂O estão ilustrados pelas linhas azuis na Figura 25B. Assim, como mostrado na Figura 25A, os valores das constantes de velocidade de segunda ordem (k_N) foram correlacionados ortogonalmente com tais parâmetros por meio de regressões múltiplas utilizando como base a Equação 17, levando ao ajustes das curvas experimentais.

Figura 25. A. Constantes de segunda ordem da reação (k_N) de IMZ (●) e 1MEI (○) com o DEDNPP e constantes de velocidade para hidrólise espontânea do DEDNPP (k_{obs}) (■) em cada fração molar da mistura DMSO/H₂O. **B.** As linhas azuis representam os valores dos parâmetros SA, SB e SPP. Em **A.** e **B.** as linhas vermelhas representam o ajuste dos dados experimentais por regressões múltiplas em função dos coeficientes SA, SB e SPP utilizando a Equação 17.



$$\log k_N = \log k_g + A(SA) + B(SB) + P(SPP) \quad (17)$$

onde os coeficientes A, B e P referem-se às contribuições de cada parâmetro do solvente, respectivamente e k_g corresponde a constante de velocidade da reação no estado gasoso, situação em que os parâmetros A, B e P são nulos, indicando ausência de interação solvente-soluto.

Para fins comparativos, a contribuição da solvólise do triéster (k_0) também foi determinada em cada composição de solvente e foi observado que a reação é duas vezes mais rápida em meio 100% aquoso do que em DMSO puro, sendo este o meio de menor reatividade. Análise da Figura 25A evidencia que os compostos 1MEI e IMZ apresentaram alta reatividade na degradação do DEDNPP em todas as misturas de solvente analisadas, reiterando que correspondem a catalisadores eficientes, não apenas em meio 100% aquoso. Cabe mencionar que o derivado metilado apresentou menor poder catalítico que o IMZ em todas as composições avaliadas. Apesar disso, foi observado que ambos os nucleófilos são mais reativos (maior k_N) em meio contendo 100% DMSO do que em água pura ou qualquer composição da mistura binária. Ainda na Figura 25, pôde-se notar que entre 0 e 20% de DMSO ocorreu uma diminuição na velocidade de ambas as reações nucleofílicas, sendo esse comportamento já relatado em estudo envolvendo a hidrólise alcalina de fosfodiésteres.¹³³ De fato, o maior desvio da idealidade em soluções DMSO/H₂O ocorre na composição de 20% de solvente orgânico, podendo acarretar em alterações significativas nas propriedades do meio,¹³⁴ influenciando a velocidade das reações. A partir de 30% de DMSO, a velocidade das reações com 1MEI e IMZ aumenta até DMSO puro, sendo observada menor influência do meio no 1MEI, devido a menor variação em k_N . Esse efeito mostra que, curiosamente, a diferença na reatividade dos nucleófilos pode ser modulada por alterações na composição do meio.

A partir dos parâmetros SA, SB e SPP de cada uma das misturas em cada fração molar da mistura binária, os valores de $\log k_N$ foram ajustados estatisticamente, fornecendo como resultado os coeficientes A, B e P. A fim de avaliar se a omissão da contribuição de um ou dois parâmetros acarretaria em melhora no coeficiente de correlação (R^2) e minimização dos erros, algumas modificações da Equação 17 foram propostas para o ajuste dos dados experimentais. As Equações 18 a 20 consideram dois dos termos da Equação 17, deixando o terceiro nulo, enquanto nas Equações 21 a 23, apenas um dos termos foi mantido, como evidenciado na Tabela 12. Apesar das reações nucleofílicas terem sido o foco principal, os dados experimentais da reação de hidrólise foram igualmente ajustados com a Equação 17. Assim, as contribuições de SA, SB e SPP,

bem como os parâmetros estatísticos obtidos com o emprego das Equações 17 a 23, estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12. Coeficientes A, B e P referentes aos parâmetros do solvente, obtidos pelos ajustes por regressões múltiplas das constantes de velocidade das reações do DEDNPP com IMZ e 1MEI em misturas DMSO/H₂O.^a Equações 17 a 23 evidenciadas e cada linha, respectivamente.

	<i>Equação</i>	<i>log k_g</i>	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>P</i>	<i>R²</i>	<i>F^b</i>
Hidrólise	17	-6,54 ±0,66	0,74 ±0,15	0,67 ±0,22	1,34 ±0,52	0,95	58,4
IMZ	17	6,98 ±1,60	-2,82 ±0,37	-3,39 ±0,55	-6,00 ±1,27	0,96	77,8
	18	-4,40 ±1,65		0,68 ±0,34	2,44 ±1,77	0,61	8,8
	19	-0,51 ±0,44	-1,29 ±0,34	-1,38 ±0,66	--	0,82	24,4
	20	-1,56 ±1,94	-0,58 ±0,19	--	0,12 ±1,89	0,73	14,3
	21	-6,43 ±1,48	--	--	4,81 ±1,5	0,48	9,4
	22	-2,13 ±0,13	--	1,00 ±0,26	--	0,57	14,2
	23	-1,43 ±0,05	-0,59 ±0,10	--	--	0,76	32,2
	1MEI	17	4,45 ±1,40	-2,06 ±0,32	-2,57 ±0,48	-4,38 ±1,11	0,92
18		-3,90 ±1,23	--	0,41 ±0,26	1,80 ±1,32	0,54	6,8
19		-1,03 ±0,33	-0,95 ±0,27	-1,10 ±0,50	--	0,78	18,8
20		-2,02 ±1,51	-0,37 ±0,15	--	0,26 ±1,47	0,65	10,4
21		-5,13 ±1,04	--	--	3,24 ±1,06	0,46	10,3
22		-2,22 ±0,10	--	0,65 ±0,20	--	0,49	10,7
23		-1,76 ±0,04	-0,39 ±0,08	--	--	0,69	23,2

^a Erros apresentados entre parênteses. ^b Valor F: parâmetro estatístico obtido pela análise variacional baseado na distribuição F, em que valores mais altos indicam melhores resultados.¹³⁵

Quando os dados experimentais foram ajustados utilizando apenas um dos parâmetros da escala de Catalán, ou seja, equações 21 a 23 da Tabela 12, foram obtidos resultados estatísticos insatisfatórios tomando como base os erros e os baixos valores de R^2 e F, principalmente com relação à SB e SPP. Com a utilização de dois parâmetros (Equações 18 a 20) houve relativa melhora nos resultados, porém com erros ainda consideravelmente elevados. De fato, estudo anterior mostrou que a utilização de menos parâmetros pode levar a melhores resultados,¹³³ porém, nesse trabalho, apenas mediante a utilização conjunta de SA, SB e SPP (Equação 17) foi possível obter resultados estatisticamente satisfatórios, com erros relativamente baixos e coeficientes de correlação superiores a 0,92. Assim, em consonância com o proposto em outros estudos,^{133,136} apenas os coeficientes advindos da aplicação da Equação 17 foram analisados, visto que apresentaram melhores ajustes aos dados experimentais.

Para a reação do DEDNPP com 1MEI e IMZ, os valores negativos dos coeficientes A, B e P indicam que esses parâmetros contribuem para diminuir a velocidade das reações. A polarizabilidade, como esperado, apresentou o coeficiente mais negativo dentre os três parâmetros visto que, diferentemente de SA e SB, o fator SPP na escala de Catalán apresenta valores elevados (aproximadamente 1,0) em todas as composições da mistura DMSO/H₂O (Figura 25B). Os coeficientes negativos referentes à acidez (A) e basicidade (B), indicam que há estabilização de ambos os nucleófilos por doação e recepção de ligações de hidrogênio com meio, respectivamente, diminuindo assim os valores de k_N .¹³³ Mesmo assim, SB é a contribuição mais importante na reatividade em relação a SA, uma vez que apresenta coeficiente mais negativo. Ainda na Figura 25B, acima da composição de 20% DMSO/H₂O as velocidades das reações nucleofílicas aumentam concomitantemente à diminuição de SA e aumento de SB, sendo notável que em 40% DMSO a basicidade do meio supera a acidez, na escala de Catalán, como mostrado na Figura 25B.

Os ajustes dos dados experimentais referentes à reação de hidrólise espontânea do DEDNPP também apresentaram melhores parâmetros estatísticos quando tratados considerando todos os termos de Catalán (Equação 17). O valor negativo de $\log k_g$ sugere que essa reação em fase gasosa é na ordem de 10^6 vezes mais lenta do que em qualquer solução DMSO/H₂O, sendo que, de acordo com

valores positivos de A, B e P, a acidez, basicidade e polarizabilidade do meio favorecem o processo. Em outras palavras, a solvatação torna a reação mais rápida e essa evidência está de acordo com trabalho recente de Nome e colaboradores, em que foi mostrado que três moléculas de água estão envolvidas no mecanismo de hidrólise de fosfotriésteres, doando e recebendo ligações de hidrogênio.⁶⁶ Em contrapartida, os valores positivos de $\log k_g$ referentes à degradação do DEDNPP por 1MEI e IMZ, indicam que a reação em fase gasosa é 9×10^6 e 4×10^8 vezes mais rápida do que em solução (considerando 20% DMSO/H₂O), respectivamente. Esses resultados, quando atrelados aos coeficientes A, B e P negativos e comparados à hidrólise, estão condizentes com a hipótese de que, nesse caso, os reagentes são estabilizados pelo meio, desfavorecendo o ataque nucleofílico ao triéster.

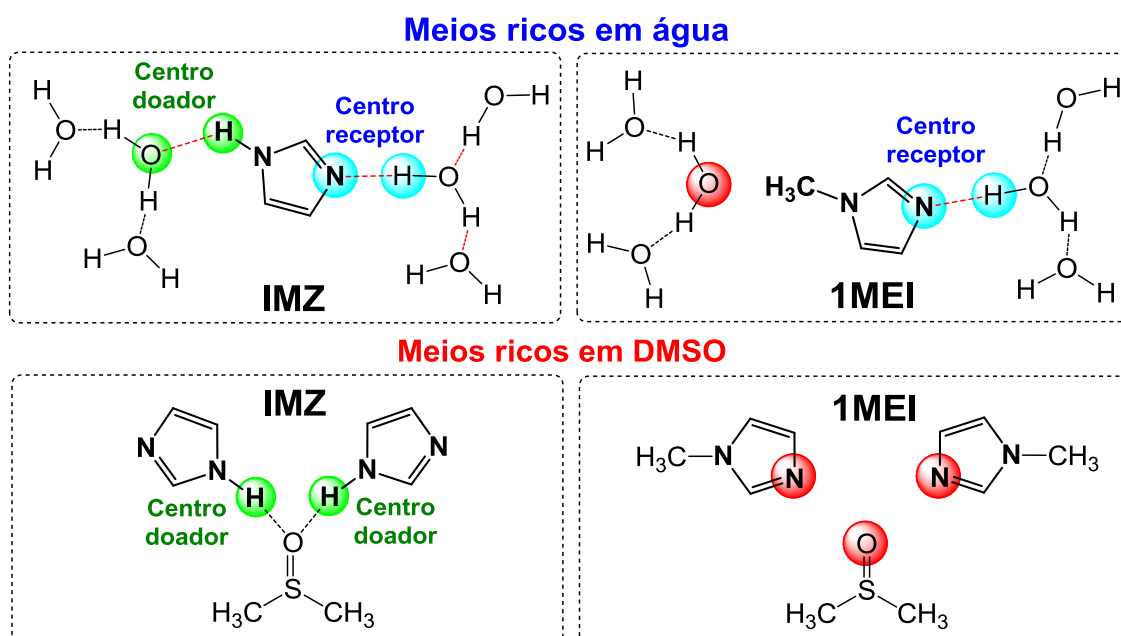
Assim, por mais que os ajustes por regressões múltiplas mostraram que a solvatação é um fator importante na velocidade das reações estudadas, para avaliar os diferentes efeitos moduladores do meio na reatividade do 1MEI e IMZ, foi necessário atrelar à análise as estruturas moleculares e suas possíveis interações intermoleculares. Na Tabela 13 estão apresentadas as razões entre as constantes de velocidade de clivagem do DEDNPP referentes aos nucleófilos e solvólise nas composições mais relevantes. Com exceção da composição de 20% DMSO, a razão k_{IMZ}/k_{MEI} aumentou com a redução da quantidade de água no sistema em todas as composições avaliadas. Portanto, à medida que capacidade de formação de ligação de hidrogênio pelo meio diminui (misturas ricas em DMSO), a atividade nucleofílica do IMZ cresce em relação ao 1MEI. Como mostrado na Figura 26, IMZ e 1MEI podem se comportar com receptores de ligação de hidrogênio pelo meio, visto que apresentam par de elétrons não ligantes do nitrogênio. Contudo, apenas o IMZ pode atuar como doador de ligações de hidrogênio, devido à presença do grupo N-H e, conseqüentemente, a sua interação atrativa com água é mais intensa, já que o 1MEI apresenta grupo metila substituindo o hidrogênio no IMZ.

Tabela 13. Razões mais relevantes entre as constantes de velocidade em diferentes composições da mistura DMSO/H₂O.^a

Composição	k_{IMZ}/k_0	k_{1MEI}/k_0	k_{IMZ}/k_{1MEI}
100% H ₂ O	389,5	269,5	1,44
20% DMSO/H ₂ O	316,6	110,6	1,43
100% DMSO	2143,7	527,6	2,03

^a sendo considerado k_0 em s⁻¹.

Figura 26. Possibilidades de formação de ligação de hidrogênio soluto-solvente em meios ricos em água ou DMSO.



Portanto, o aumento mais pronunciado na nucleofilicidade do IMZ em ambientes ricos em DMSO tem relação com a diminuição de possibilidades de formação de ligação de hidrogênio, como ilustrado na Figura 26, visto que se trata de solvente polar aprótico, o que aumenta seu poder nucleofílico. Como o DMSO se comporta apenas como receptor de ligações de hidrogênio, o aumento na sua composição pode levar a formação de maior número de complexos do tipo IMZ-DMSO-IMZ. Assim, é razoável considerar que esse complexo apresente forças de interação atrativas mais fracas comparado ao caso similar H₂O-IMZ-H₂O, sendo essa hipótese amparada pelos valores de k_{IMZ} , visto que se apresenta sutilmente maior em DMSO do que em água.

Como discutido previamente, nas reações nucleofílicas de clivagem do DEDNPP a basicidade da mistura binárias de solventes apresentou maior influência do que a acidez na velocidade, com IMZ mais afetado que 1MEI ($A^{\text{IMZ}} = -2,82$; $A^{\text{1MEI}} = -2,06$; $B^{\text{IMZ}} = -3,39$; $B^{\text{1MEI}} = -2,57$). Pôde-se propor, então, que o IMZ apresentaria reatividade ainda maior em outros solventes apróticos que possuem menores valores de SB, visto que a interação soluto-solvente seria menor e, portanto, acarretando maior mobilidade ao nucleófilo no meio reacional. A menor contribuição de SA e SB na reação envolvendo o 1MEI pode ter origem na ausência de grupo doador de ligação de hidrogênio no nucleófilo, o que resulta em menor susceptibilidade de alterações do meio em sua reatividade, por ser menos intensamente solvatado. Como consequência, o IMZ mostrou-se 3,04 vezes mais reativo em DMSO do que em água, enquanto para o 1MEI, essa razão é de 2,16 vezes.

Ainda na tentativa de compreender a diminuição da velocidade das reações do DEDNPP com ambos os nucleófilos até a composição de 20% DMSO/H₂O (Figura 25A), os parâmetros termodinâmicos das reações nucleofílicas foram determinados por meio de plot de Eyring. Por apresentarem as razões $k_{\text{IMZ}}/k_{\text{1MEI}}$ mais relevantes (Tabela 13), estudos foram realizados nas composições de 0, 20 e 100% DMSO/H₂O, com resultados mostrados na Tabela 14. Cabe mencionar que, mesmo com as alterações do meio reacional, os valores de entropia e energia livre de ativação mostraram-se de acordo com mecanismo nucleofílico, ora proposto no estudo dos xMEI mediante técnicas de RMN e cálculos teóricos (*vide supra*).

Tabela 14. Parâmetros termodinâmicos referentes às reações do IMZ e 1MEI com DEDNPP em diferentes composições de solventes.^a

		ΔH^\ddagger , kcal mol ⁻¹	ΔS^\ddagger , cal K ⁻¹ mol ⁻¹	ΔG^\ddagger , kcal mol ⁻¹
DMSO 0%	IMZ	7,7±0,7	-42,6±0,2	20,4
	1MEI	9,58±1,0	-37,0±6,7	20,6
DMSO 20%	IMZ	8,74±0,9	-39,4±3,0	20,5
	1MEI	10,4±0,7	-34,8±2,3	20,8
DMSO 100%	IMZ	6,85±0,4	-43,2±1,3	19,7
	1MEI	7,79±0,68	-40,7±2,3	19,9

^a obtidos a 298 K.

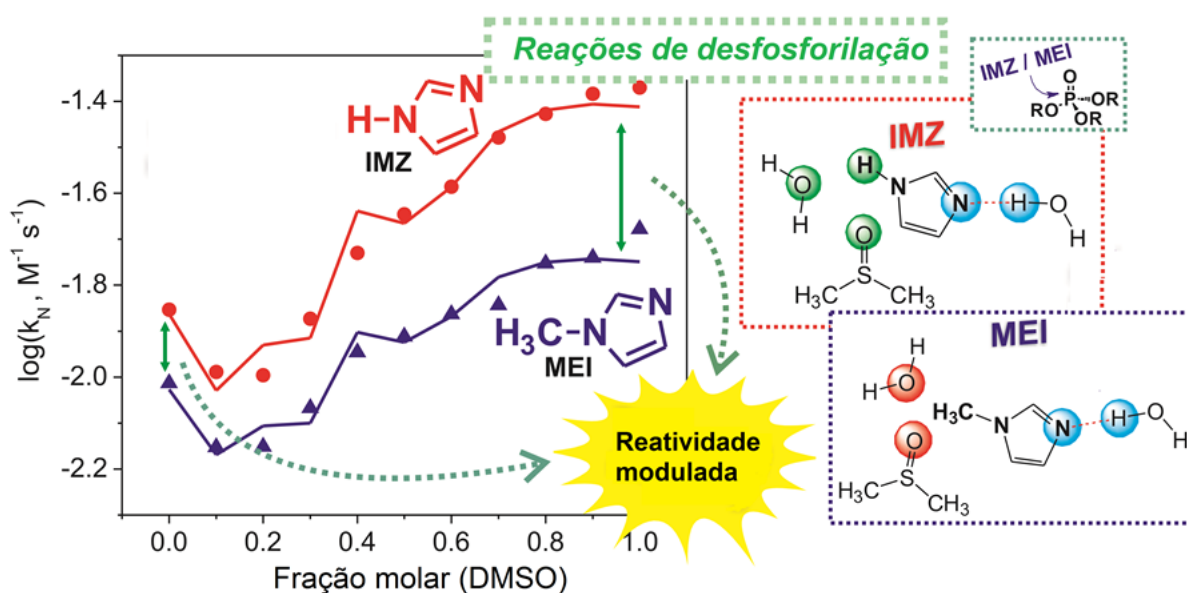
Os parâmetros termodinâmicos apresentados na Tabela 14 podem ser razoavelmente relacionados com resultados obtidos por Lu e colaboradores, que estudaram misturas DMSO/H₂O por meio de espectroscopia de impedância eletroquímica. Nessa técnica, o sistema fornece uma resposta mediante a aplicação de uma corrente alternada de pequena amplitude, com medições realizadas em diferentes frequências da corrente. As análises permitiram a obtenção de parâmetros termodinâmicos de diversos sistemas contendo apenas DMSO e H₂O, sendo mostrado que a entalpia e entropia de ativação para rompimento de interações intermoleculares possuem valores máximos da faixa de 0,15 a 0,4 DMSO/H₂O.¹³⁷ Esse comportamento foi atribuído à formação de ligações de hidrogênio mais fortes entre DMSO e H₂O do que entre duas moléculas de água, tendo relação com a composição estequiométrica de formação de complexos H₂O-DMSO-H₂O em 0,33% DMSO/H₂O.¹³⁷ Assim, o desfavorecimento das reações do 1MEI e IMZ com DEDNPP na faixa de 10 a 30% DMSO/H₂O pode ter sua origem na mais homogênea distribuição de cargas do sistema binário de solventes. De fato, os valores de entalpia de ativação de ambas as reações aumentam de 0 a 20% DMSO e diminuem em DMSO puro (Tabela 14), estando em consonância com os resultados de entalpia de ativação obtidos por espectroscopia de impedância eletroquímica,¹³⁷ que seguem o mesmo comportamento.

4.3.1. Conclusões Parciais

O efeito do solvente na reação dos nucleófilos IMZ e 1MEI com DEDNPP foi quantitativamente investigado em diferentes misturas binárias DMSO/H₂O, por meio de regressões múltiplas dos dados cinéticos, combinados à acidez, basicidade e polarizabilidade do meio de acordo com a escala de Catalán.¹³² Os coeficientes positivos obtidos para acidez, basicidade e polarizabilidade do meio refletem que a solvatação tem função estabilizadora em ambos os nucleófilos, levando a diminuição da velocidade de reação bimolecular com DEDNPP. Ao diminuir a composição do solvente polar prótico, a reatividade do IMZ se enaltece em relação ao 1MEI, mostrando o caráter modulador do meio atuando diferentemente em cada nucleófilo, como ilustrado na Figura 27.

Assim, no desafio de alcançar resultados relacionando os parâmetros do solvente com a velocidade das reações, a incorporação de interpretações moleculares das espécies envolvidas, levou a melhor compreensão dos efeitos moduladores do meio na reatividade dos nucleófilos. Nesse contexto, observou-se que quanto menor a possibilidade de formação de ligações de hidrogênio soluto-solvente, maior é a reatividade do IMZ relativa à do 1MEI.

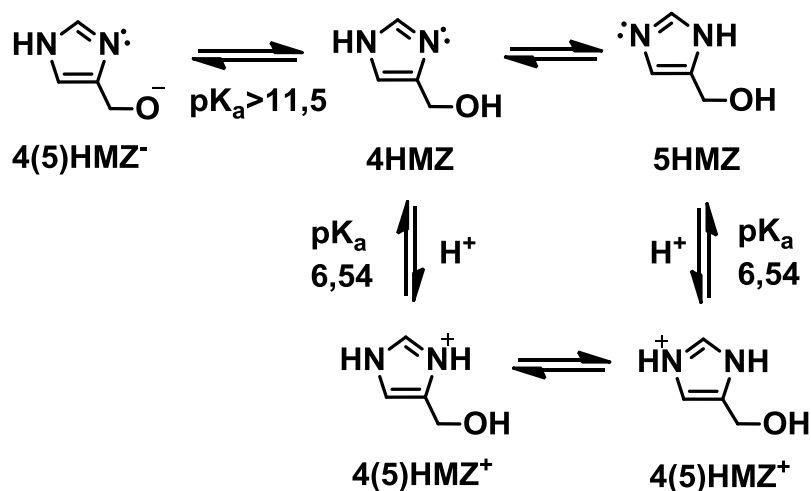
Figura 27. O efeito modulador do meio na velocidade das reações do 1MEI e IMZ com DEDNPP devido a diferentes interações solvente-soluto.



4.4. Efeito do substituinte na reatividade do imidazol: o caso do 4(5)-hidroximetilimidazol

Com base nos resultados obtidos na investigação da reação do 4(5)MEI com DEDNPP, especificamente com relação às consequências do equilíbrio tautomérico assimétrico na reatividade, estudos envolvendo o 4(5)HMZ também foram realizados. Como mostrado no Esquema 36, a forma protonada do derivado (4(5)HMZ⁺) apresenta pK_{aH} 6,54¹³⁸ e estima-se que a espécie neutra possua pK_a acima de 11,5, levando à formação do 4(5)HMZ⁻, porém não relatado na literatura. Em sua forma neutra, o 4(5)HMZ apresenta tautômeros com estruturas diferentes em solução aquosa, sendo que a presença da hidroxila no substituinte acrescenta possíveis efeitos eletrônicos distintos daqueles observados no caso dos xMEI. No 4HMZ, por exemplo, o substituinte situa-se na posição 4 do anel de IMZ, estando próximo do nitrogênio nucleofílico e, portanto, o grupo OH pode influenciar na reatividade do derivado. Assim, para avaliar o efeito do grupo -CH₂OH na atividade catalítica do anel de IMZ na reação com DEDNPP, foram realizados estudos cinéticos com UV-Vis, análises de EM e RMN, e também cálculos teóricos.

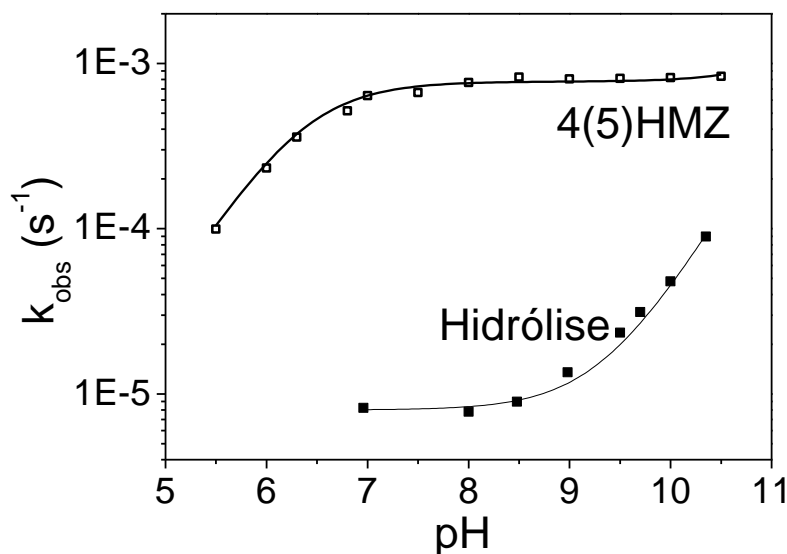
Esquema 36. Equilíbrio tautomérico do 4(5)HMZ.



4.4.1. Estudos cinéticos

O estudo cinético da reação do 4(5)HMZ com DEDNPP por UV-Vis foi realizado inicialmente obtendo-se o perfil de pH apresentado na Figura 28. Foi observado um aumento na constante de velocidade na faixa até pH 8, indicando que a desprotonação da espécie 4(5)HMZ⁺ (Esquema 36), leva à formação da espécie neutra reativa, tendo em vista que seu valor de pK_{aH} é de 6,54.¹³⁸ A espécie catiônica não apresenta reatividade significativa, pois a protonação acarreta na indisponibilidade de par de elétrons não ligantes para ataque nucleofílico. Devido a insignificante quantidade de 4(5)HMZ⁺ disponível para desprotonação em soluções com pH acima 8, a população da espécie neutra em solução torna-se máxima, originando o patamar nas constantes de velocidade (pH 8 a 10,5). O 4(5)HMZ apresenta ainda outro valor de pK_a condizente com a desprotonação da espécie neutra, levando à formação da espécie aniônica, porém não foi estudada visto que, como mencionado, esse valor está estimado acima de 11,5. Os dados experimentais foram satisfatoriamente ajustados com a Equação 4, sendo contabilizadas as hidrólises espontânea (k₀) e alcalina (k_{OH}), além da contribuição do nucleófilo da reatividade do nucleófilo (k_N).

Figura 28. Perfil cinético em função do pH referente às reações do 4(5)HMZ (0,2 mol L⁻¹) com DEDNPP e hidrólise espontânea do triéster, a 25 °C. As linhas sólidas correspondem aos ajustes realizados com a Equação 4.



Os parâmetros cinéticos determinados pelo perfil de pH e os termodinâmicos, obtidos a partir de plot de Eyring (ver Apêndice) e das Equações 14 e 15, estão apresentados na Tabela 15. Os resultados mostraram que o 4(5)HMZ apresenta alta atividade catalítica com DEDNPP, com incrementos catalíticos na ordem de 10^4 vezes, comparados com a hidrólise espontânea. Ainda assim, a atividade catalítica do 4(5)HMZ se mostrou 4,5 vezes menor que a do IMZ, porém, deve-se ressaltar que considerando apenas soluções com pH menor que 6, o derivado apresentou reatividade superior ao anel não substituído, sendo atribuído ao menor valor de pH_{aH} ($\text{pK}_{\text{a}}^{\text{IMZ}}=6,95$)²

Tabela 15. Parâmetros cinéticos e termodinâmicos^a da reação do 4(5)HMZ a $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ com DEDNPP.^b

Parâmetro	Valor	Parâmetro	Valor
$k_0, {}^{120} 10^{-6} \text{ s}^{-1}$	$8,0 \pm 0,5$	$k_{\text{H}_2\text{O}}/k_{\text{D}_2\text{O}}$ ^d	1,3
$k_{\text{OH}}, {}^{120} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$0,25 \pm 0,02$	$\Delta H^\ddagger, \text{ kcal mol}^{-1}$ ^b	$9,91 \pm 0,4$
$k_{\text{N}}, {}^c \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$3,96 \times 10^{-3} \pm (6,57 \times 10^{-5})$	$\Delta S^\ddagger, \text{ cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ^b	$-43,0 \pm 1,3$
pK_{aH}	$6,54$ ¹³⁸	$\Delta G^\ddagger, \text{ kcal mol}^{-1}$ ^b	22,8

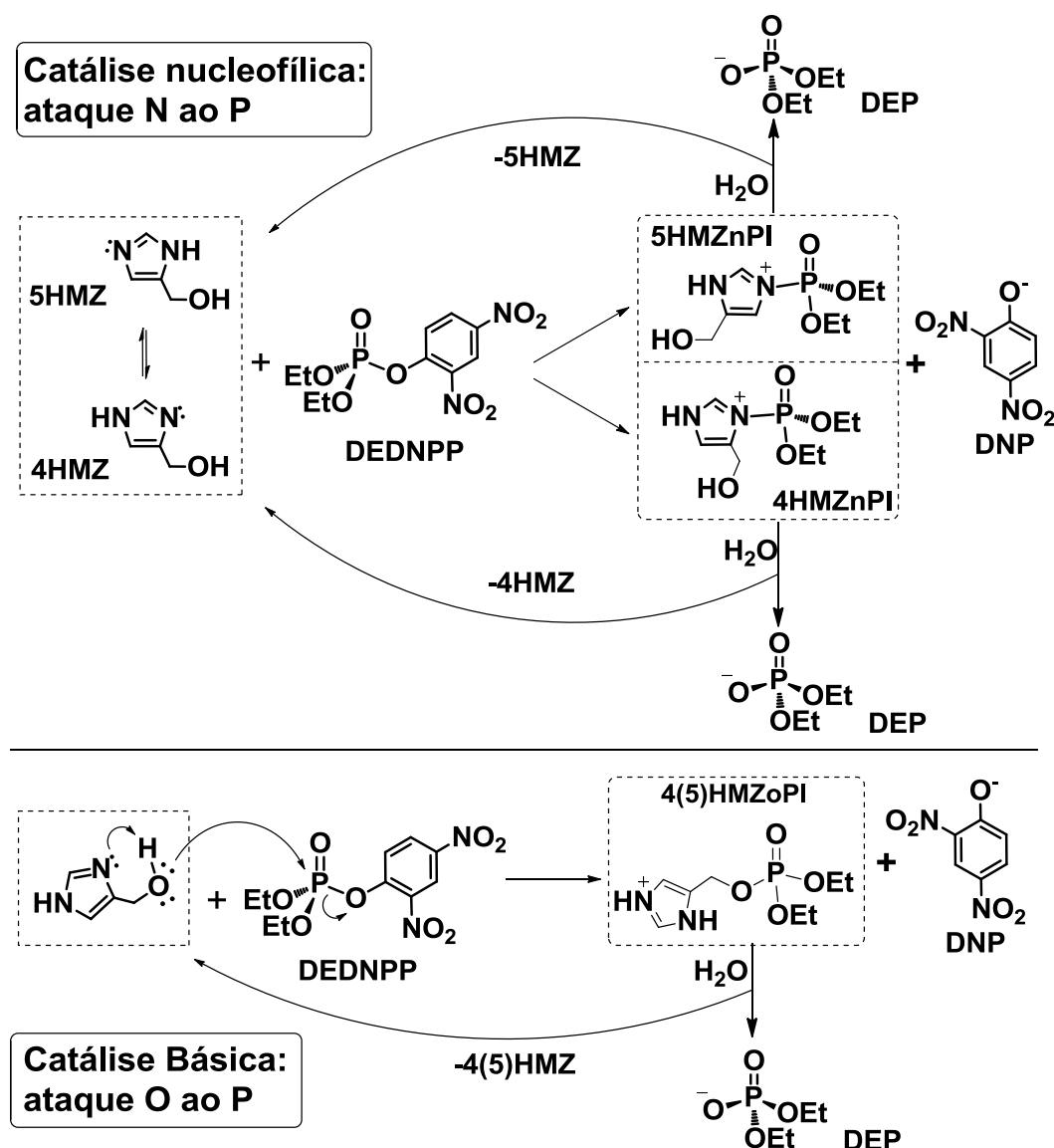
^a obtidos pelas equações 13, 14 e 15. ^b a 25°C e pH 8,5. ^c a partir do resultado do ajuste do perfil de pH da Figura 28. ^d Obtido por ajuste do perfil de pD e pH na faixa de pH de 5,5 a 8 utilizando a Equação 4 a 25°C .

Os dados apresentados na Tabela 15 estão de acordo com mecanismo bimolecular, com ataque nucleofílico do par de elétrons não ligante do nitrogênio do 4(5)HMZ ao fósforo do DEDNPP, sendo análogo aqueles propostos no caso dos xMEI, como mostrado no Esquema 37. Porém, outro caminho relativo a um possível ataque pelo OH foi considerado, visto que este tem possibilidade de ser auxiliado por catálise básica intramolecular proporcionada pelo nitrogênio desprotonado do 4(5)HMZ, aumentando a nucleofilicidade do oxigênio da hidroxila, também apresentado no Esquema 37. Assim, a reação do 4(5)HMZ como DEDNPP pode ocorrer via caminhos competitivos, sendo considerados os mecanismos de ataque nucleofílico ao fósforo via (i) oxigênio da hidroxila, (ii) nitrogênio do tautômero 4HMZ e (iii) nitrogênio do tautômero 5HMZ. Entretanto, pode-se considerar que o ataque pelo OH é o menos provável, devido ao baixo valor de efeito isotópico observado (1,3, Tabela 15), não condizente com uma transferência de próton durante a reação

e, portanto, não sendo indicativo de mecanismo básico geral.¹²¹ Outras possibilidades reacionais proporcionadas pela espécie aniônica do 4(5)HMZ, como por exemplo um ataque nucleofílico pelo alcóxido do 4(5)HMZ⁻ (Esquema 36), não foram consideradas, tendo em vista que na faixa de pH avaliada a desprotonação do derivado em sua forma neutra não é favorável.

Nesse contexto, para uma investigação mais profunda acerca dos mecanismos de reação de degradação do DEDNPP mediada por 4(5)HMZ, visando estabelecer a rota preferencial e qual das espécies do par tautomérico apresenta maior reatividade, análises de EM, RMN e cálculos teóricos foram realizados.

Esquema 37. Propostas mecanísticas para a reação do 4(5)HMZ neutro com DEDNPP.



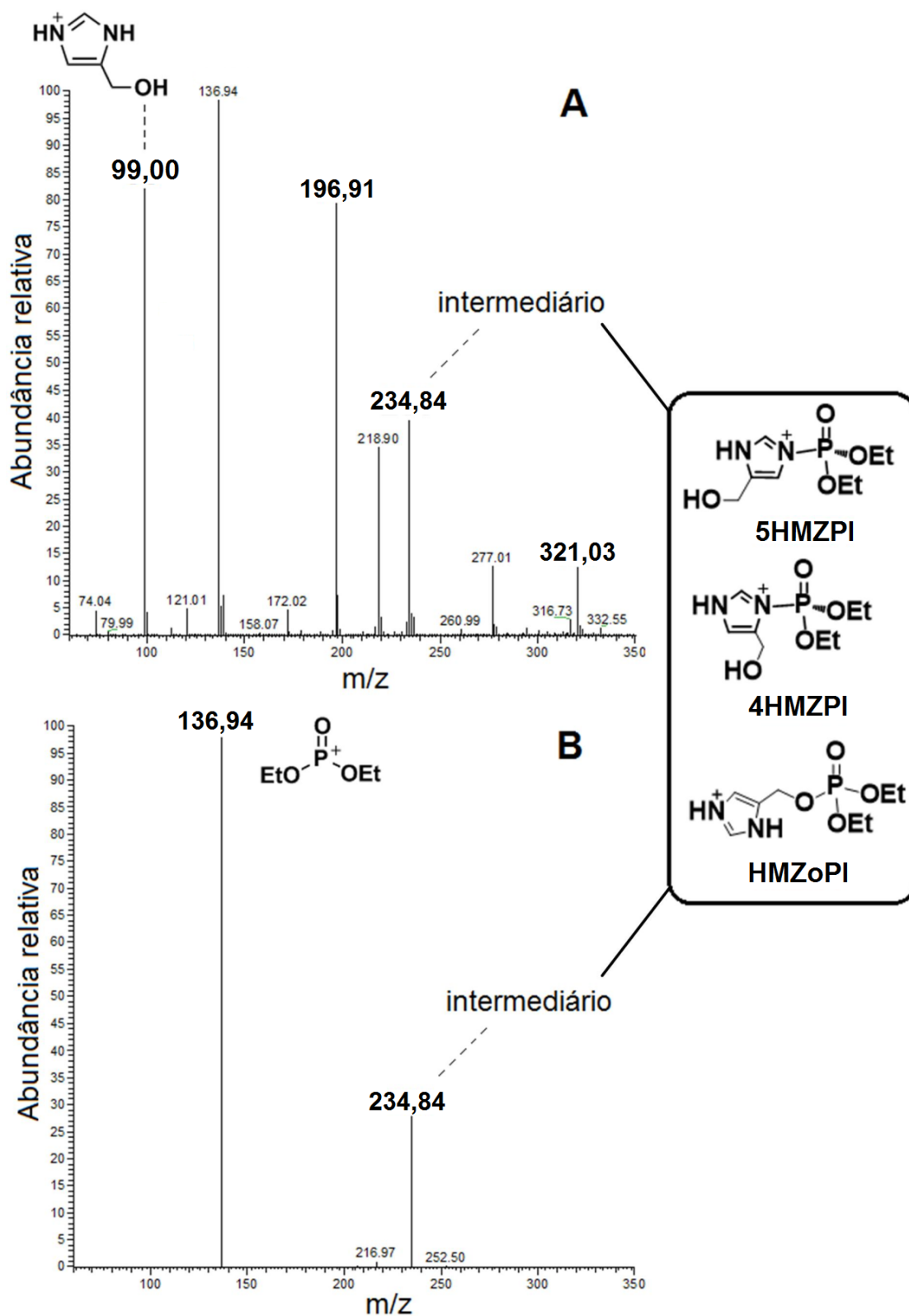
4.4.2. Elucidação mecanística por espectrometria de massas

Com a intenção de investigar a formação de intermediários e, conseqüentemente, obter novas evidências referentes às propostas mecanísticas da reação do 4(5)HMZ com DEDNPP, análises por EM foram realizadas utilizando ESI-MS e ESI-MS/MS.

No espectro adquirido durante a reação, apresentado na Figura 29A, o íon de m/z 99 detectado no modo positivo foi associado ao 4(5)HMZ protonado, enquanto o sinal observado em 197 Da pode ser condizente com a espécie resultante da reação de dimerização do 4(5)HMZ. Além disso, o íon detectado em 321 Da foi atribuído ao DEDNPP. Foi observado, ainda, um importante sinal em 235 Da também no modo positivo, confirmando a formação de um intermediário de reação derivado do 4(5)HMZ, denominado 4(5)HMZ-INT, sendo condizente com os mecanismos propostos no Esquema 37. No entanto, cabe ressaltar que esse sinal pode ser referente ao intermediário resultante tanto do ataque pelo nitrogênio via tautômero 5HMZ ou 4HMZ, quanto aquele formado pelo ataque do oxigênio da hidroxila, visto que os três apresentam a mesma massa, como também ilustrado na Figura 29. Com o intuito de adquirir mais informações acerca da estrutura referente ao sinal de m/z 235 Da, foi realizada ESI-MS/MS e, de fato, a espécie $\text{PO}_3(\text{Et})_3^+$ de m/z 137 Da foi detectada. Apesar de confirmar que o sinal deve ser de um intermediário fosforilado, esse fragmento não fornece informações acerca do mecanismo preferencial da reação do 4(5)HMZ com DEDNPP, visto que pode ser resultante da decomposição qualquer intermediário, seja pela clivagem da ligação P-N, caso a reação se processe formando 5HMZnPI ou 4HMZnPI, ou da ligação P-O, no caso de formação da espécie HMZoPI (Esquema 37).

Assim, os resultados obtidos por meio de análises por EM reforçam a hipótese de mecanismo bimolecular, com formação do 4(5)HMZ-INT. No entanto, considerando apenas as análises por EM, não foi possível determinar qual é o centro nucleofílico mais reativo do 4(5)HMZ. Caso o ataque via nitrogênio seja o mais favorável, resta ainda determinar qual espécie no par tautomérico corresponde ao nucleófilo atuante, visto que todos os intermediários propostos apresentam a mesma relação massa/carga, até mesmo para os fragmentos (Figura 29). Assim, análises por RMN e cálculos teóricos foram realizados visando à obtenção de novas evidências acerca da reação do 4(5)HMZ com DEDNPP.

Figura 29. A. Espectro EM (+) obtido durante a reação do 4(5)HMZ a $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ com DEDNPP $7,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em pH 8,5. **B.** ESI-MS/MS do sinal em m/z 235 Da e estrutura dos intermediários.



4.4.3. Elucidação mecanística por ressonância magnética nuclear

Na busca por maiores evidências para proposição do mecanismo preferencial da reação do 4(5)HMZ com DEDNPP, análises por espectroscopia de RMN de ^1H , ^{13}C , e ^{31}P foram realizadas. Como mencionado, no estudo da reação do 4(5)MEI com DEDNPP foi observada a formação de dois intermediários de reação devido à detecção de dois diferentes sinais no RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$, indicando que ambos os tautômeros participam da clivagem do triéster. No caso do 4(5)HMZ, porém, foi observado apenas um sinal adicional em -5,7 ppm, além dos sinais típicos do DEDNPP e DEP, sendo atribuído ao 4(5)HMZ-INT. Essa observação é uma evidência de que os tautômeros do 4(5)HMZ apresentam maior diferença de reatividade que no caso do 4(5)MEI, visto que no estudo com o derivado metilado, foi possível detectar os intermediários resultantes das reações do 4MEI e do 5MEI sendo formados simultaneamente. Cabe ressaltar que no espectro de RMN de ^1H , outros sinais em 4,27 e 1,34 ppm, característicos de grupos etoxila, foram detectados (ver Apêndice), sendo diferentes daqueles referentes ao DEDNPP e DEP e atribuídos ao 4(5)HMZ-INT (Esquema 37). Os deslocamentos químicos mais relevantes estão apresentados na Tabela 16.

Tabela 16. Dados referentes às espécies detectadas nas reações do 4(5)HMZ com DEDNPP^a por RMN (600 MHz, H₂O/D₂O).^b

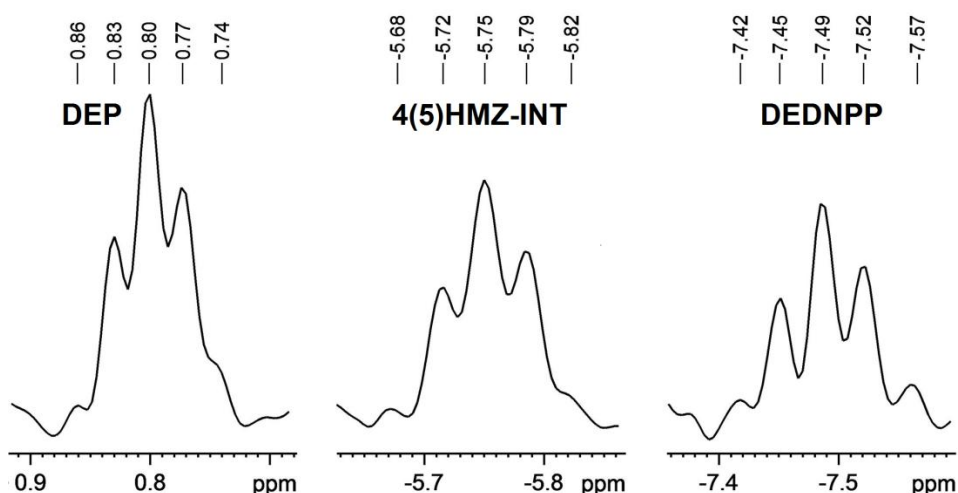
Composto	δ_{H}	δ_{P}
4(5)HMZ	7,73 (s, 1H), 7,11 (s, 1H), 4,60 (d, 2H)	--
DEDNPP	8,96 (dd, 1H), 8,62 (dd, 1H), 7,79 (dd, 1H), 4,37 (dq, 4H), 1,38 (td, 6H)	-7,5
4(5)HMZ-INT	8,03 (d, 1H), 7,34 (s, 1H), 4,58 (dq 2H), 4,27 (dq, 4H), 1,34 (td, 6H)	-5,7
DNP	8,86 (d, 1H, Ar), 8,10 (dd, 1H, Ar), 6,74 (d, 1H, Ar)	--
DEP	3,91 (dq, 4H, CH ₂), 1,25 (t, 6H, CH ₃)	0,8

^a 4(5)HMZ a 0,11 mol L⁻¹, pH 8,5 a 25 °C. ^bTabela completa no apêndice.

Apesar de não serem inequívocas, algumas evidências nas análises por RMN podem ser consideradas para sugerir o centro nucleofílico principal do 4(5)HMZ. No caso do RMN de ^1H , por exemplo, foi observado um sinal em 7,73 ppm para o

hidrogênio do carbono 2 do anel de IMZ no derivado 4(5)HMZ isolado, sendo que esse mesmo hidrogênio apresenta sinal em 8,03 no intermediário, sugerindo mudança no seu ambiente químico (Tabela completa no Apêndice). Essa observação é condizente com ataque pelo nitrogênio ao fósforo, visto que na reação ocorrendo pelo oxigênio, o anel de IMZ ficaria muito distante de outros grupos da molécula e, portanto, não alteraria significativamente seu deslocamento químico em comparação ao 4(5)HMZ em solução. Além disso, os três sinais detectados no espectro de ^{31}P referentes ao DEDNPP (-7,5 ppm), DEP (0,8 ppm) e 4(5)HMZ-INT (-5,7 ppm) apresentam o mesmo padrão de desdobramento (quintetos) como mostrado na Figura 30. Esse comportamento é uma evidência de que essas espécies sofram apenas a influência dos hidrogênios dos dois grupos etoxilas provenientes do DEDNPP. Um possível ataque via oxigênio do 4(5)HMZ acarretaria na presença de outro grupo OCH_2R ligado ao fósforo, o qual implicaria no aumento da multiplicidade.

Figura 30. Ampliação do espectro de RMN de ^{31}P para a reação de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ DEDNPP com HMZ a $0,11 \text{ mol L}^{-1}$, pH 8,5, $25 \text{ }^\circ\text{C}$.



Visando obter mais evidências para elucidação do caminho preferencial de reação, na tabela 17 estão apresentados alguns deslocamentos químicos de outras espécies relevantes de maior e menor similaridade estrutural em relação ao 4(5)HMZ-INT, para fins comparativos. Outro indicativo de ataque via nitrogênio do 4(5)HMZ recai no deslocamento químico do sinal atribuído ao intermediário da reação, observado em -5,7 ppm, estando dentro da faixa observada para os x-MIPI e

IPI (-4,9 a -6,9 ppm, Tabela 17). Caso o ataque ocorresse via oxigênio, poderia se esperar um sinal no espectro de RMN de ^{31}P mais próximo daquele observado para DEP, em 0,7 ppm, visto que ambas as espécies teriam 4 ligações P-O. Podem-se citar ainda outros fosfatos com maior similaridade estrutural e eletrônica em torno do átomo de fósforo (quatro grupos OR), como o trietilfosfato (TEP) e o trimetilfosfato (TMP), que possuem sinais em -1,5 ppm e 3,00 ppm,¹³⁹ respectivamente. Portanto, sugere-se que o 4(5)HMZ-INT deve ter estrutura similar aos intermediários fosforilimidazóis, com 3 grupos OR e uma ligação N-P, corroborando as outras evidências obtidas pelo RMN e os estudos cinéticos por UV-Vis.

Tabela 17. Deslocamentos químicos relevantes do 4(5)HMZ-INT, x-MIPI, IPI, DEP, TEP e TMP.

Espécie	Estrutura	δ_{P} , ppm	Espécie	Estrutura	δ_{P} , ppm
4(5)HMZnPI		-5,7	IPI		-6,9 ^a
5-MIPI		-5,6	DEP		0,7
4-MIPI		-5,2	TEP		-1,5 ¹³⁹
2-MIPI		-4,9	TMP		3,0 ¹³⁹

^a Determinado recentemente pelo nosso grupo de pesquisa.

Buscando ainda maiores detalhes para compreensão do mecanismo de reação do 4(5)HMZ com DEDNPP, espectros sucessivos de RMN de ^{31}P foram adquiridos pelo monitoramento dos sinais das espécies envolvidas, como mostrado na Figura 31. De fato, foi observado o consumo do triéster, levando ao aparecimento do 4(5)HMZ-INT, que por sua vez sofre reação de hidrólise formando o produto final DEP, presente desde o início da reação. Para o estudo cinético, foi realizado o cálculo das integrais dos sinais referentes a cada espécie, permitindo a determinação de perfil da concentração relativa ao longo do tempo. Os perfis cinéticos estão mostrados na Figura 32.

Figura 31. Espectros sucessivos de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ obtidos da reação do 4(5)HMZ ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) com DEDNPP ($7,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em pH 8,0 a $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

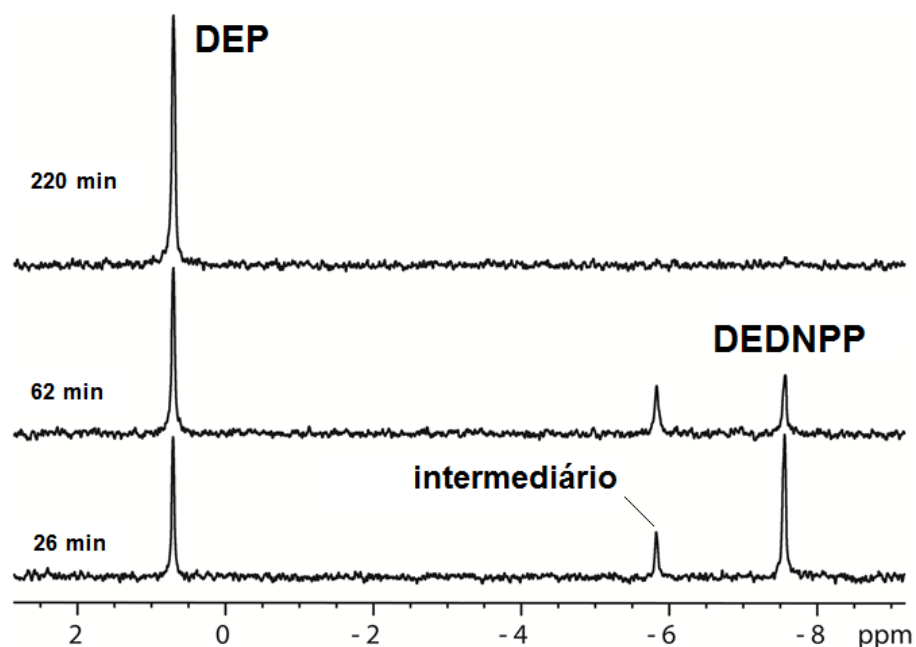
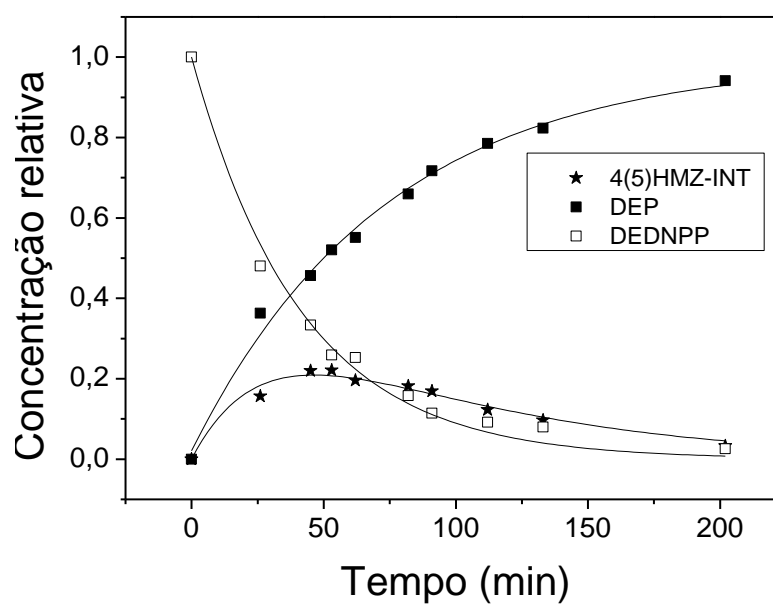


Figura 32. Perfil de concentração vs tempo obtido por RMN de ^{31}P da reação do 4(5)HMZ ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) com DEDNPP.



Por meio de ajustes baseados em equações de velocidade para reações consecutivas (Equação 16), foram calculados os parâmetros cinéticos e os resultados estão apresentados na Tabela 18. O estudo cinético por RMN está de acordo com os resultados obtidos por UV-Vis (Tabela 15), tendo em vista as similares constantes de velocidade de formação do intermediário. O 4(5)HMZ-INT apresentou menor estabilidade perante a hidrólise em comparação aos x-MIPI (Tabelas 8 e 18) e esse comportamento tem relação com a acidez dos derivados de IMZ, visto que o 4(5)HMZ apresenta o menor valor de pK_{aH} comparado aos xMEI e, portanto, trata-se de um melhor grupo abandonador ($pK_{aH}^{HMZ} 6,54$; $^{138} pK_{aH}^{xMEI} > 7,21$, Tabela 2).

Tabela 18. Parâmetros cinéticos referentes ao 4(5)HMZ-INT formado na reação do 4(5)HMZ com DEDNPP, obtidos pelos perfis mostrados na Figura 32.

Parâmetro	$k_1, M^{-1}min^{-1}$	k_2, min^{-1}	meia-vida, min
Valor	$1,06 \times 10^{-3} \pm 6,86 \times 10^{-5}$	$0,033 \pm 1,4 \times 10^{-3}$	21,0

As análises por RMN se mostraram em concordância com os outros resultados provenientes do estudo cinético e análises por EM. Algumas evidências foram observadas nos espectros de RMN, sugerindo que a reação se processe via nitrogênio do nucleófilo e, diante desses resultados, cálculos teóricos foram realizados visando estabelecer o caminho reacional mais favorável e determinar qual espécie no par tautomérico apresenta maior reatividade.

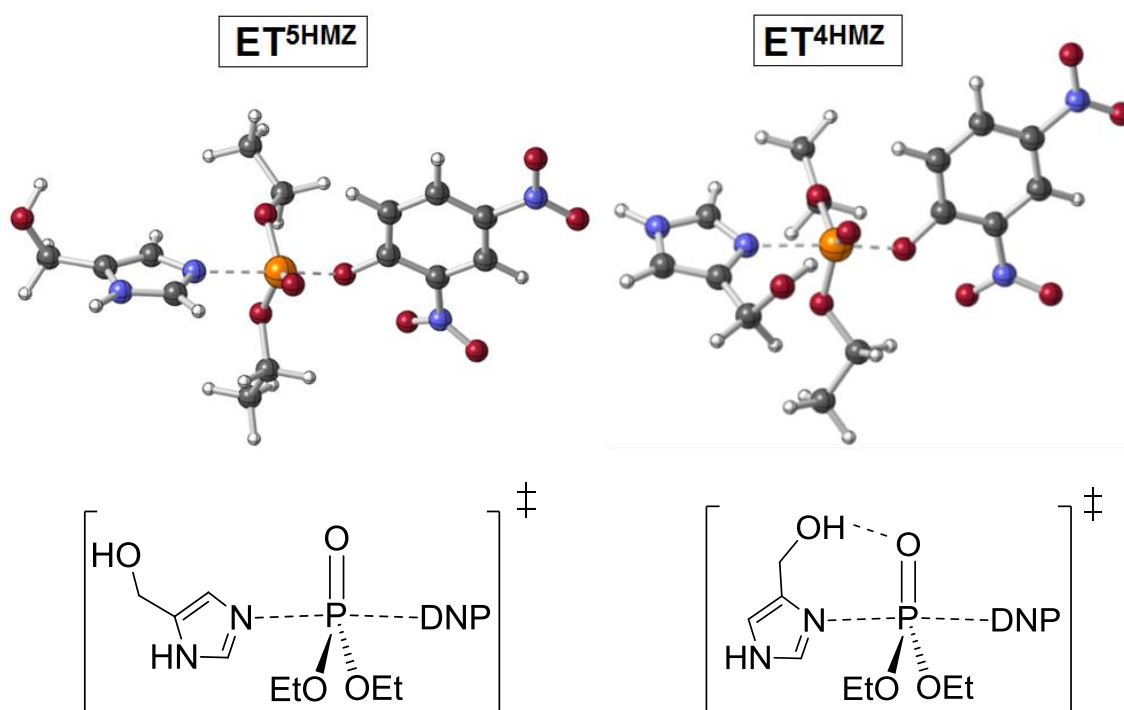
4.4.4. Cálculos teóricos

Com a utilização de técnicas de EM e RMN foi possível confirmar a formação do intermediário fosforilado na reação do DEDNPP com 4(5)HMZ e, portanto, reiterando os mecanismos propostos no estudo cinético. Porém, diante da dificuldade da elucidação estrutural plena e da necessidade de maiores detalhes acerca das estruturas envolvidas e do efeito do substituinte, cálculos foram realizados para obtenção de mais informações referentes à reatividade do 4(5)HMZ na transferência do grupo fosfato do DEDNPP. A escolha do método de cálculo foi feita com base no estudo dos xMEI (*vide supra*), em que houve melhor

reprodutibilidade dos dados experimentais com a utilização do funcional B3LYP combinado ao conjunto de base 6-31+G(d,p).

Para as reações envolvendo os ataques via nitrogênio ao fósforo pelos tautômeros 4HMZ e 5HMZ, cálculos indicaram que a estrutura pentacoordenada resultante da formação da ligação N-P e clivagem da ligação P-O corresponde a um ET, confirmando mecanismo concertado, como mostrado na Figura 33.

Figura 33. Estruturas dos ET via mecanismo $S_N2(P)$ referentes à reação do 4HMZ e 5HMZ com DEDNPP em nível B3LYP/6-31G+(d,p).



No caso da reação ocorrendo via oxigênio, além do mecanismo no qual a transferência do próton da hidroxila para o IMZ e o ataque nucleofílico do oxigênio aniônico ocorreriam de maneira concertada, também foi proposto que essa reação ocorreria em duas etapas, com ataque do alcóxido posterior à abstração do próton pelo IMZ (Esquema 38). Após obtenção das estruturas dos ET (ver apêndice), foram determinadas as barreiras de ativação referente a cada uma das duas propostas, e o mecanismo em duas etapas se mostrou mais favorável. Entretanto, mesmo assim, a rota envolvendo o ataque nucleofílico pelo grupo OH do 4(5)HMZ se mostrou desfavorável, apresentando elevado valor de energia de ativação (31 kcal mol^{-1}),

sendo pelo menos 6 kcal mol⁻¹ mais alta em comparação aos ataques pelo nitrogênio, como mostrado na Figura 34. Assim, conforme esperado pelos estudos cinéticos, a reação do 4(5)HMZ com DEDNPP se dá fundamentalmente pelo nitrogênio do anel IMZ.

Esquema 38. Mecanismos propostos para o ataque do oxigênio do 4HMZ ao DEDNPP.

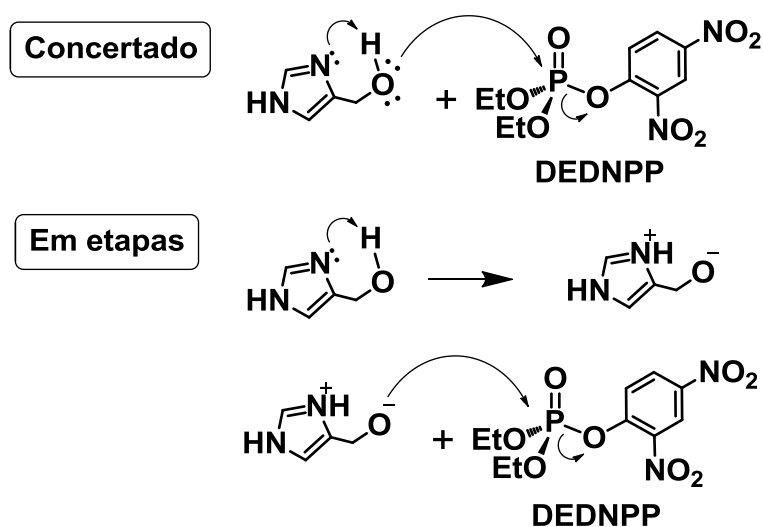
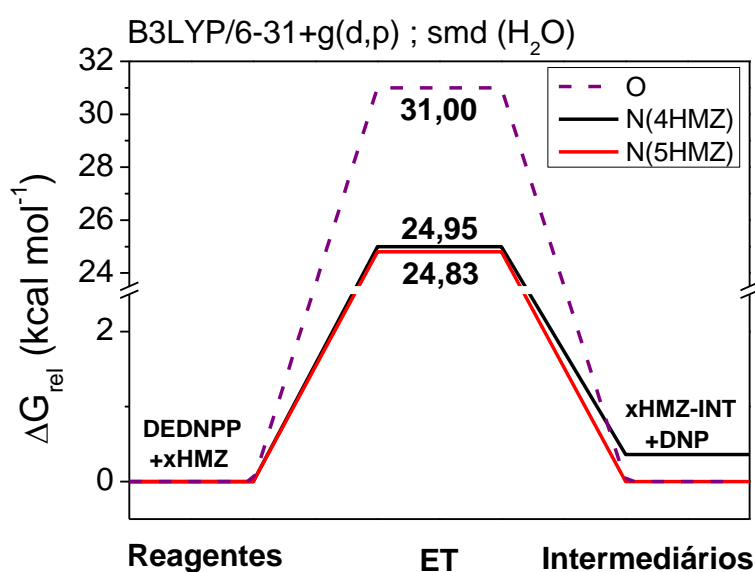


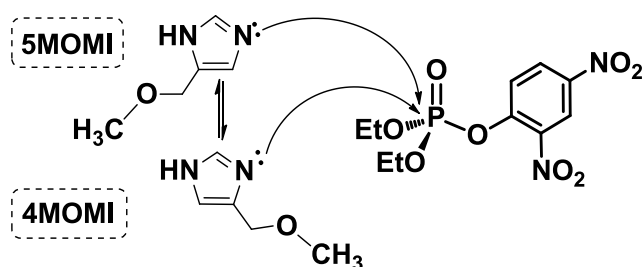
Figura 34. Diagrama de energia livre de ativação (kcal mol⁻¹) das reações de clivagem do DEDNPP via nitrogênio do 4HMZ e 5HMZ e via oxigênio.



Dentre os mecanismos de ataque via nitrogênio, foram obtidas energias de ativação similares para ambos os tautômeros do 4(5)HMZ na reação com DEDNPP, sendo o 5HMZ sutilmente mais reativo, apresentando barreira em torno de 0,1 kcal mol⁻¹ mais baixa que no caso do 4HMZ (Figura 34). Esses resultados são interessantes, visto que no estudo da reação envolvendo o 4(5)MEI, o tautômero de maior impedimento estérico, ou seja, de menor reatividade (4MEI), apresentou barreira de ativação 3 kcal mol⁻¹ mais alta que seu par 5MEI, que por sua vez apresentou a maior nucleofilicidade dentre os xMEI e IMZ (vide supra). Assim como no 4MEI, na estrutura do ET envolvendo o 4HMZ, o substituinte causa impedimento estérico no nitrogênio nucleofílico (Figura 33), e, conseqüentemente, seria esperada grande diferença de reatividade em relação ao 5HMZ. No entanto, isso não foi observado, o que pode ser explicado pelo grupo -CH₂OH na posição 4 no anel de 4(5)HMZ, que proporciona a formação de ligação de hidrogênio entre a hidroxila e o oxigênio da fosforila. Essa interação estabiliza o ET, compensando o efeito estérico causado pelo substituinte, facilitando a formação do intermediário. De fato, ligações de hidrogênio são recorrentes e de grande importância em diversos processos enzimáticos.¹⁴⁰ Em contrapartida, o 5HMZ, de forma semelhante ao 5MEI, não apresentou efeito estérico evidente causado pelo substituinte na formação do ET, entretanto, a ligação de hidrogênio intramolecular não é possível, visto a grande distância entre os grupos OH e PO.

Para confirmar a importância da ligação de hidrogênio na reatividade do derivado 4(5)HMZ, a reação de desfosforilação do DEDNPP com os tautômeros do 4(5)-metoximetil-imidazol (4(5)MOMI, Esquema 39) também foi estudada mediante abordagem teórica. Essa molécula foi escolhida devido à similaridade estrutural com relação ao 4(5)HMZ e também pelo grupo éter presente no 4(5)MOMI eliminar a possibilidade de ligação de hidrogênio entre o substituinte do nucleófilo e o triéster.

Esquema 39. Par tautomérico do 4(5)MOMI e as reações com DEDNPP.



As estruturas otimizadas dos ET obtidos das reações envolvendo 4MOMI e 5MOMI estão mostradas na Figura 35. Nesse caso, como ilustrado nas barreiras de ativação da Figura 36, o efeito estérico é predominante no ataque do nitrogênio no 4MOMI, resultando em grande diferença de reatividade entre os tautômeros na clivagem do triéster, quando em comparação ao 4(5)HMZ. Assim, o 4MOMI apresentou barreira de ativação quase $3,5 \text{ kcal mol}^{-1}$ mais alta que o 5MOMI, mostrando que quando não há compensação pela formação de ligação de hidrogênio, o tautômero com ausência de efeito estérico apresenta reatividade consideravelmente superior, como também observado experimentalmente no caso do 4(5)MEI.

Figura 35. Estruturas dos ET via mecanismo $S_N2(P)$ referentes às reações do 4MOMI e 5MOMI com DEDNPP obtidas com método B3LYP/6-31G+(d,p).

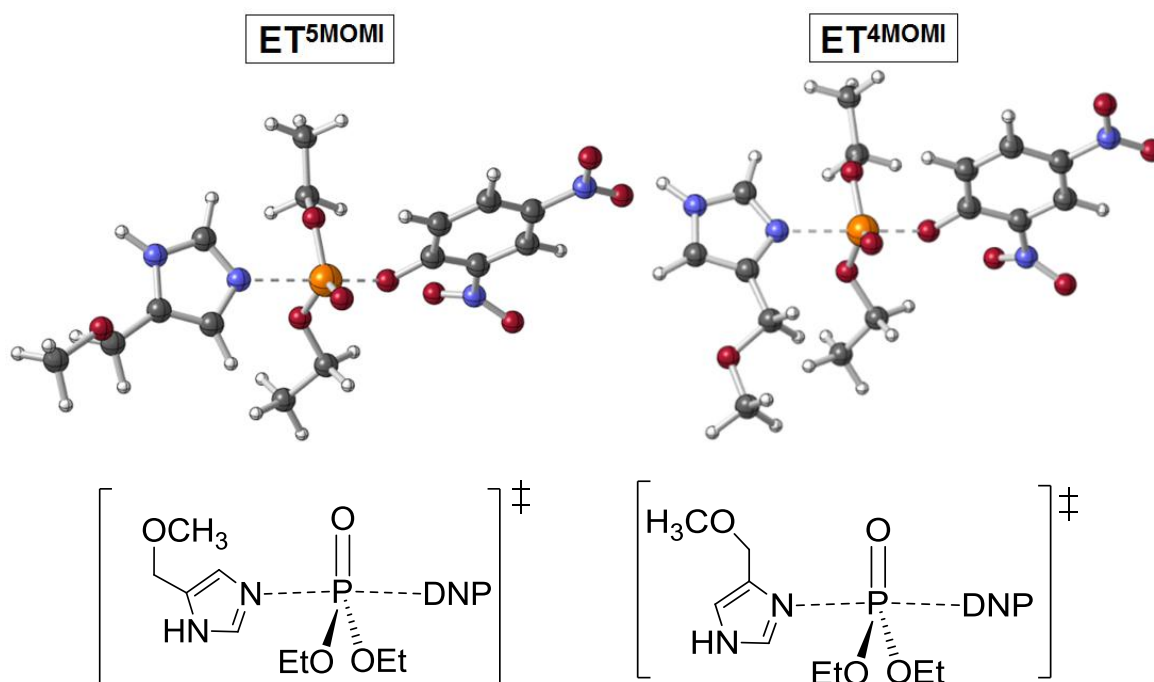
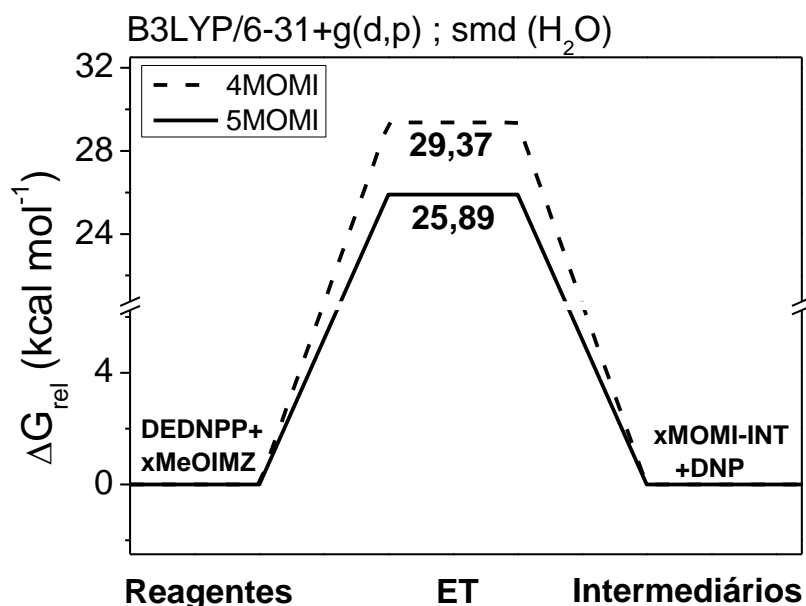
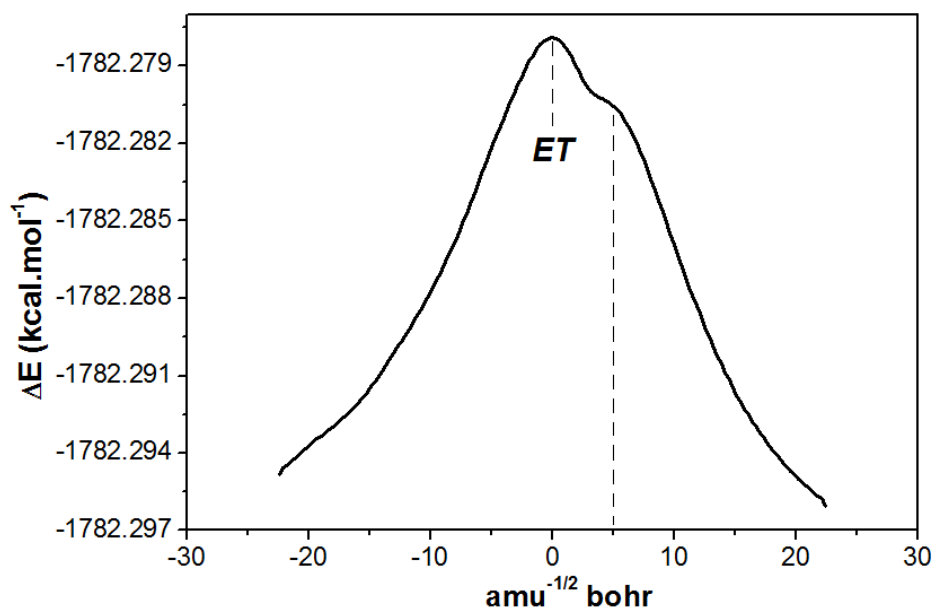


Figura 36. Diagrama de energia livre de ativação (kcal mol^{-1}) das reações de clivagem do DEDNPP do 4MOMI e 5MOMI.



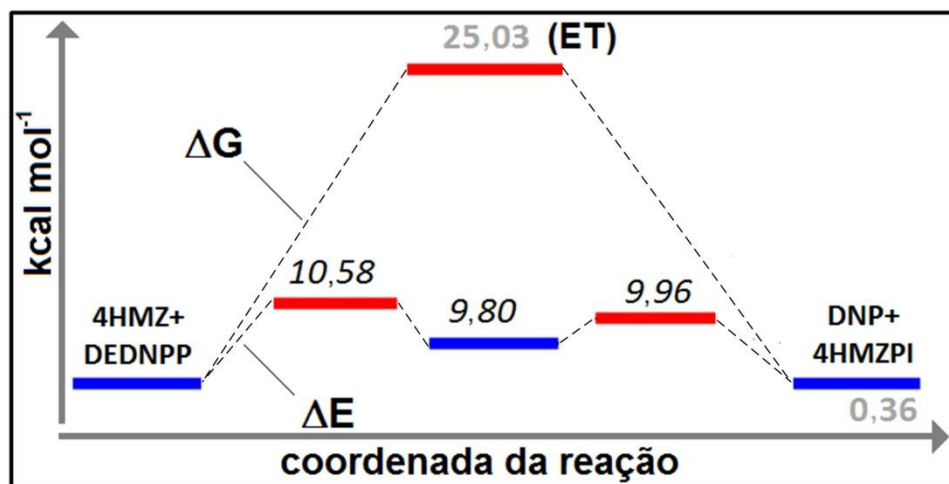
Visando adquirir ainda mais detalhes acerca dos mecanismos, cálculos IRC referente às reações de desfosforilação mediadas por ambos os tautômeros do 4(5)HMZ também foram realizados. De fato, o ataque nucleofílico do 5HMZ resultou em perfil compatível com mecanismo concertado (Figura 37), sendo observado considerável assincronismo após o ponto máximo de energia (ET), indicado pelo ombro em $5 \text{ amu}^{-1/2} \text{ bohr}$. Esse comportamento poderia ter sido resultante da passagem por um iminente intermediário pentacoordenado, recorrente em reações envolvendo triésteres de fosfato,^{73,100} que não fora detectado, nesse caso, pelo cálculo da IRC. Porém, cálculos posteriores desqualificaram essa hipótese, revelando que a estrutura associada ao “ombro” no IRC não correspondeu a um mínimo, mas sim a um ET de segunda ordem, e sua otimização levou a formação do intermediário de reação e DNP.

Figura 37. Perfil da IRC da reação do 5HMZ com DEDNPP.



Curiosamente, o cálculo da IRC para a reação do tautômero 4HMZ com DEDNPP, no sentido dos produtos (eliminação do DNP), finalizou logo após o primeiro passo. Após diversas tentativas, foi levantada a hipótese de que esse comportamento seria um indicativo da formação de um mínimo ocasionado pela forte ligação de hidrogênio $\text{OH}\cdots\text{OP}$ (Figura 33, $\text{ET}^{4\text{HMZ}}$), levando a um mecanismo associativo, com a formação do intermediário pentacoordenado. Cabe ressaltar, porém, que no cálculo da IRC são consideradas apenas as alterações na energia eletrônica do sistema na coordenada da reação, não incluindo a parte vibracional. Na Figura 38 são mostrados os perfis de energia eletrônica (ΔE) e energia livre de ativação ao longo da coordenada da reação com o 4HMZ, com diagrama de ΔG mostrando que não há formação de um mínimo entre o ataque nucleofílico e a liberação do DNP. Ou seja, a estrutura do ET da clivagem do DEDNPP por 4HMZ é considerado um mínimo eletronicamente, sendo, porém desqualificado pelo cálculo da energia livre, comportamento compatível com uma superfície de energia muito plana nas proximidades do ponto de sela. Esse conflito entre o cálculo termoquímico e da IRC é incomum, sugerindo que a reação ocorra via mecanismo concertado de caráter associativo, porém atingindo elevado nível de assincronismo.

Figura 38. Variação da energia livre e energia eletrônica da reação do 4HMZ com DEDNPP ao longo da coordenada da reação.



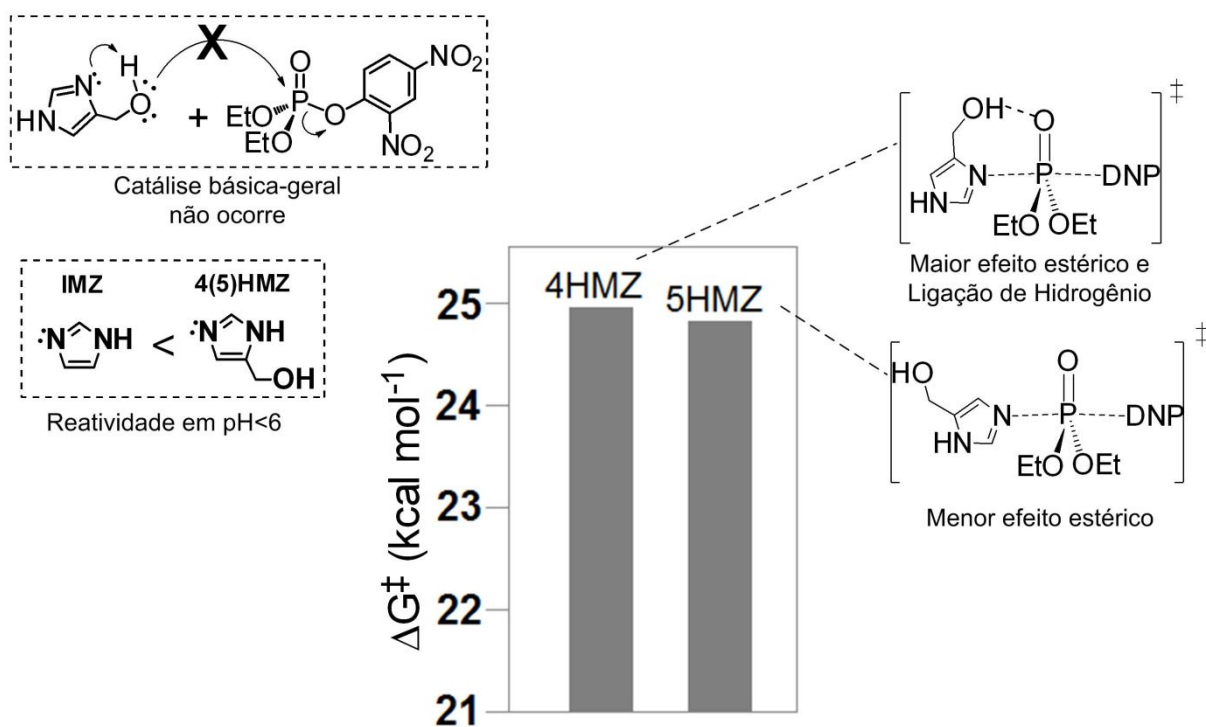
Assim, a aplicação de metodologias teóricas no estudo da reação do 4(5)HMZ com DEDNPP permitiu acessar importantes detalhes acerca da reatividade do par tautomérico, indicando que o 5HMZ é a espécie mais reativa e reafirmando o mecanismo nucleofílico proposto experimentalmente. Além disso, foi possível mostrar que a capacidade de formação de ligação de hidrogênio do 4HMZ com o triéster, faz com que a reatividade entre os tautômeros seja próxima, sendo o 5HMZ apenas sutilmente mais reativo, por não apresentar efeito estérico significativo.

4.4.5. Conclusões Parciais

A Figura 39 mostra um resumo dos resultados obtidos no estudo da reação do 4(5)HMZ com DEDNPP. O derivado apresentou elevado incremento catalítico na clivagem do DEDNPP, comparado com a respectiva reação espontânea. Além disso, foi observada reatividade sutilmente superior que a do IMZ em soluções com pH menor que 6. Por meio de estudos cinéticos e técnicas de caracterização por EM e RMN, foi possível propor que o ataque nucleofílico pelo nitrogênio ao fósforo do DEDNPP é mais favorável em comparação ao ataque via oxigênio da hidroxila. Além disso, cálculos teóricos permitiram sugerir que o 5HMZ é o responsável pela reatividade do derivado. Curiosamente, resultados de cálculo mostraram que a atividade catalítica do tautômero 4HMZ é similar à do 5HMZ, devido à possibilidade

de formação de ligação de hidrogênio entre o OH e a fosforila do triéster, que estabiliza o ET e compensa o efeito estérico causado pelo substituinte. Essa observação nos levou a investigar outros catalisadores com esse tipo de propriedade, porém sem a penalização causada pelo efeito estérico.

Figura 39. Resumo dos resultados obtidos para a reação do 4(5)HMZ com DEDNPP.



4.5. Design de novos catalisadores através de cálculos teóricos

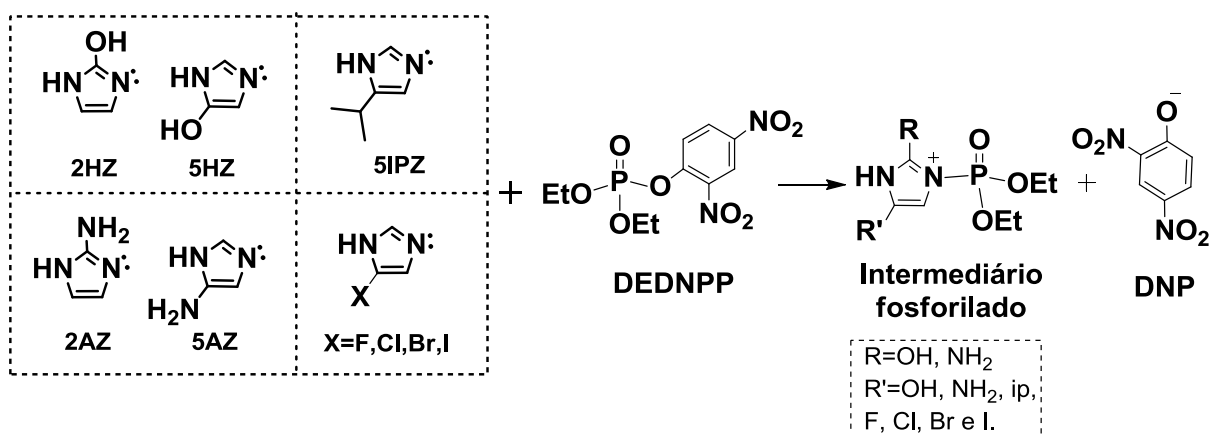
A proposição das hipóteses levantadas acerca da reatividade dos derivados de IMZ abordados nesse trabalho, só foi possível através da combinação de metodologias teóricas e experimentais. Nesse contexto, vale ressaltar que a utilização de cálculos teóricos serviu não apenas para elucidar os mecanismos, mas também para propor os efeitos gerados pela inclusão de um determinado substituinte e sua relação com a reatividade.

De maneira geral, foi observado que grupos retiradores de carga, como NO_2 , têm alta influência na reatividade do anel de IMZ, como revelado pela insignificante reatividade dos fármacos BNZ e MTZ, além do derivado 4NZ, na clivagem do DEDNPP. Curiosamente, a metila, mesmo se tratando de grupo indutor, fatores estéricos e eletrônicos atuam desfavorecendo a nucleofilicidade do IMZ, exceto quando substitui o hidrogênio da posição 5 no anel. Essa conclusão foi evidenciada pelo contraste entre as reatividades apresentadas pelos tautômeros 4MEI e 5MEI, além de outras observações (*vide supra*). Com relação ao substituinte contendo hidroxila, no estudo da reação do 4(5)HMZ com DEDNPP, foi observado que a possibilidade de formação de ligação de hidrogênio com o substrato na formação do ET é um fator importante a ser considerado. Esses resultados nos instigaram a avaliar outros derivados com substituintes potencialmente doadores de ligação de hidrogênio ou que proporcionem indução eletrônica no anel de IMZ, visando abaixamento das barreiras de ativação. Assim, tendo em vista a boa concordância entre as observações teóricas e experimentais, cálculos DFT em nível B3LYP utilizando a função de base 6-31+G(d,p) foram realizados para propor novos catalisadores bifuncionais ainda mais eficientes, que possam futuramente ser sintetizados e investigados experimentalmente. Essa estratégia pode representar grande potencial na otimização do trabalho experimental.

Como mencionado, buscou-se investigar a competição entre (i) o efeito indutivo causado por um substituinte no anel e (ii) a ligação de hidrogênio formada com o substrato. Por meio de modelagem estrutural com troca de substituintes, foram avaliados os efeitos dos grupos OH, NH_2 , isopropil (ip), e os desativadores fracos F, Cl, Br e I, como mostrado no Esquema 40. Assim, cálculos foram realizados com nove derivados monossustituídos, sendo o 2-hidroxiimidazol (2HZ),

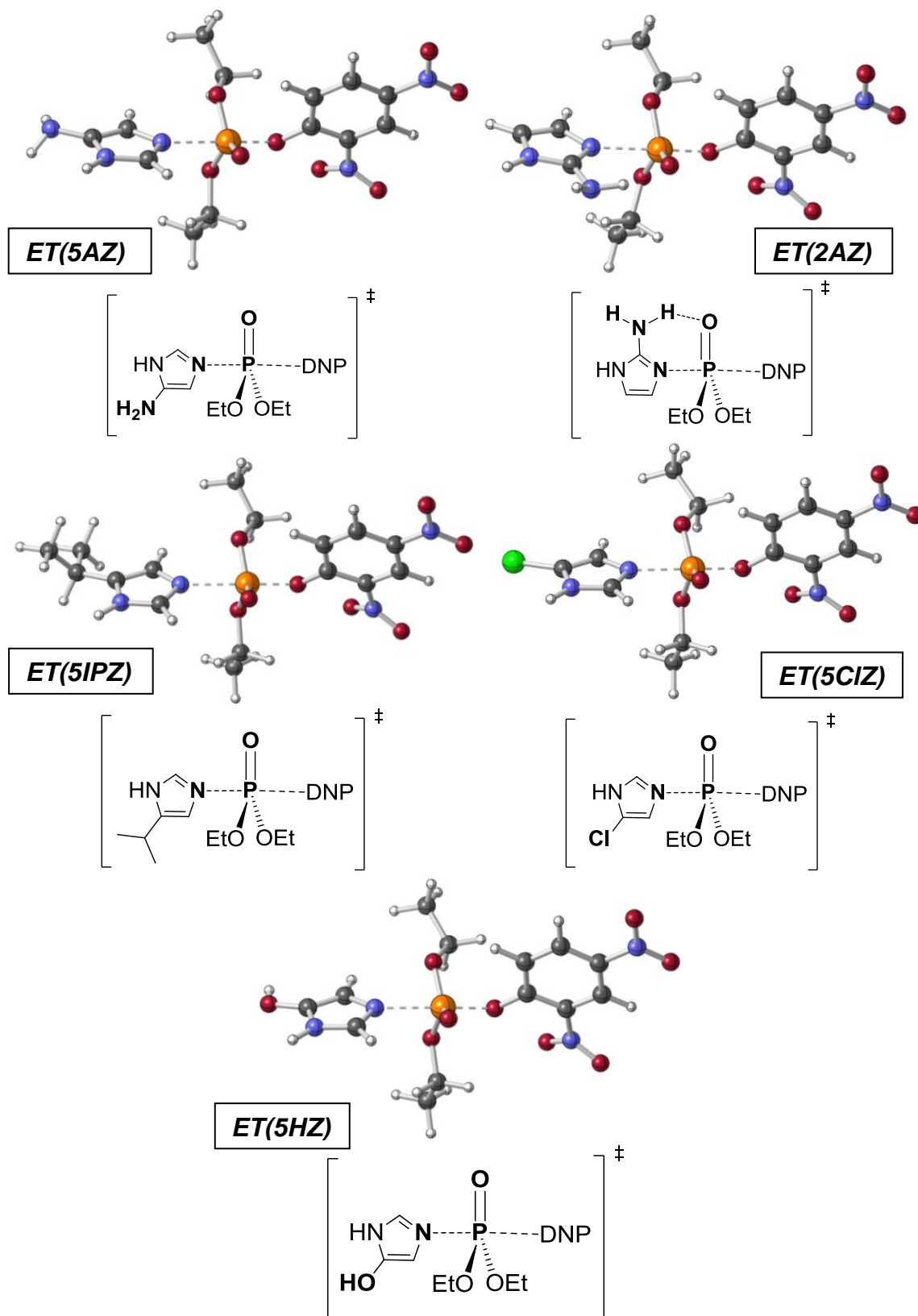
5-hidroxiimidazol (5HZ), 2-aminoimidazol (2AZ), 5-aminoimidazol (5AZ), 5-isopropilimidazol (5IPZ), além dos quatro monohalogenados, 5-fluorimidazol (5FZ), 5-cloroimidazol (5ClZ), 5-bromoimidazol (5BrZ) e 5-iodoimidazol (5IZ). Devido a influência preponderante do efeito estérico nas posições adjacentes ao par elétrons não ligantes do IMZ e devido a alta reatividade observada para o 5MEI (sessão 4.2), todos os grupos foram avaliados na posição 5 do anel, ao passo que substituintes potencialmente formadores de ligação de hidrogênio com a fosforila do DEDNPP, como NH₂ e OH, foram também investigados na posição 2. Essa posição é estratégica, visto que o grupo doador de ligação de hidrogênio estaria o mais próximo possível dos oxigênios do DEDNPP, favorecendo a interação.

Esquema 40. Derivados de IMZ propostos na reação com o DEDNPP.



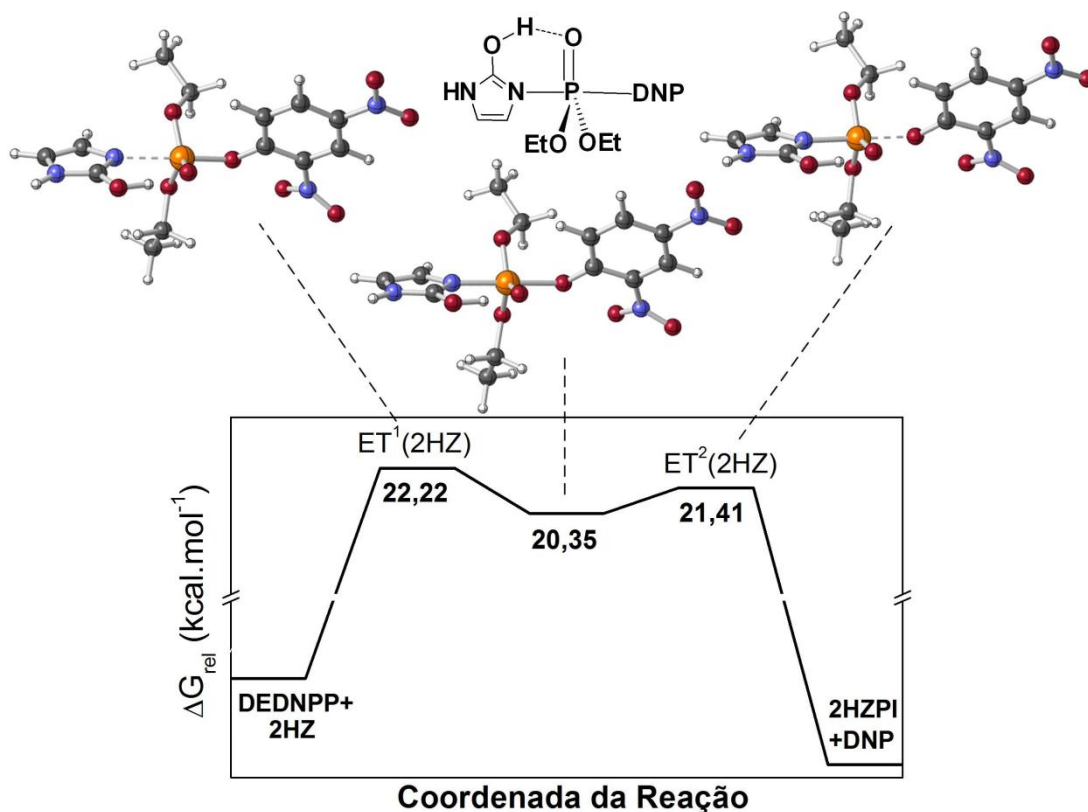
Como mostrado na Figura 40, as estruturas dos ETs pentacoordenados da reação envolvendo cada um dos derivados propostos são consistentes com mecanismo concertado, exceto para o 2HZ, como discutido na sequência. Cabe mencionar, ainda, que resultados de cálculo IRC referentes à reação do 2AZ com o triéster, mostraram elevado assincronismo, e esse comportamento é resultante da formação de ligação de hidrogênio entre o NH e o grupo fosforila do DEDNPP (Figura 40, ET(2AZ)). Esta interação estabiliza o ET, conferindo-o um caráter mais associativo, como já discutido para o caso do 4HMZ (*vide supra*).

Figura 40. Estruturas dos ET referentes às reações dos derivados de IMZ com DEDNPP obtidas em nível B3LYP combinado com a função de base 6-31+G(d,p).



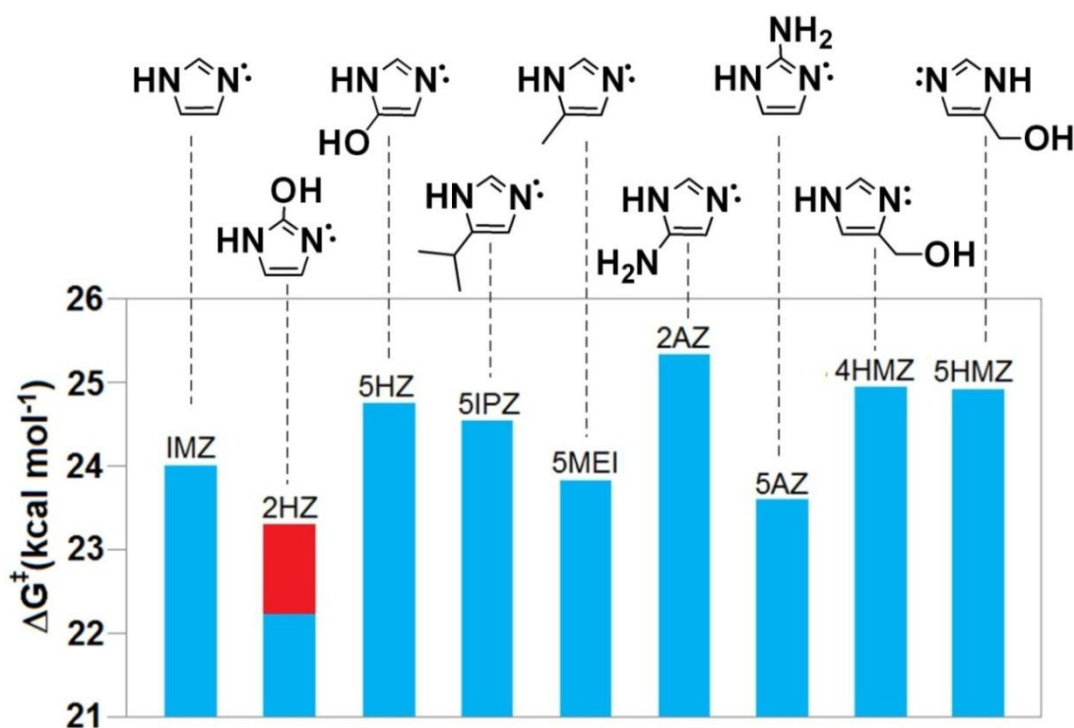
Especificamente para a reação envolvendo o 2HZ, observou-se no cálculo da IRC que o ET resultante do ataque nucleofílico ao fósforo, leva inicialmente à formação de um intermediário pentacoordenado, antes da liberação do DNP, como ilustrado no diagrama de energia da reação na Figura 41. Cabe destacar que nos casos do 4HMZ e do 2AZ, em que também se observa uma ligação de hidrogênio no ET, a formação da ligação N-P e a quebra da ligação P-O (do DNP) ocorrem em mecanismo altamente assíncronico, tendendo ao associativo, porém ainda assim concertado. Essas evidências indicam que a ligação de hidrogênio entre o OH do 2HZ com o grupo PO do triéster é suficientemente forte para tornar o mecanismo associativo, estabilizando ainda mais estrutura pentacoordenada, tornando-a um intermediário, em contraste ao 2AZ e 4HMZ. De fato, a estrutura do intermediário pentacoordenado foi reotimizada, confirmando se tratar de um mínimo de reação. Além disso, no mecanismo A_N+D_N observado para o 2HZ, o ataque nucleofílico é correspondente à etapa determinante da velocidade, visto que a barreira de 22,22 kcal mol⁻¹ (Figura 41) é muito mais alta que aquela referente à liberação do DNP, de apenas 1,06 kcal mol⁻¹, indicando que a segunda etapa da reação deve ser rápida.

Figura 41. Diagrama de energia livre de ativação (kcal mol⁻¹) da reação de clivagem do DEDNPP com 2HZ determinado via método B3LYP/6-31+G(d,p).



Assim, as barreiras reacionais foram determinadas para todas as reações de desfosforilação propostas, sendo ilustradas na Figura 42 aquelas obtidas para o 5HZ, 2AZ, 5AZ, 5IP e 2HZ (ambas as etapas). Para fins comparativos, também foram incluídas aquelas referentes ao IMZ, 5MEI e 4HMZ. Da mesma forma que para os outros casos mostrados em sessões anteriores, a determinação das energias de ativação foi realizada considerando os reagentes infinitamente separados.

Figura 42. Barreiras de ativação das reações dos derivados de IMZ com DEDNPP (B3LYP/6-31+G(d,p)). Para o 5CIZ $\Delta G^\ddagger=37,2$ kcal mol⁻¹, omitida para facilitar a visualização.



No caso dos derivados substituídos em 5 (5HZ, 5AZ, 5AZ e 5IP), foi observado que apenas o NH₂ contribuiu para aumentar a nucleofilicidade do IMZ, em comparação ao anel não substituído, além do CH₃, já discutido na sessão 4.2. O grupo NH₂ foi sutilmente mais efetivo que a metila, sendo observados abaixamentos de 0,22 e 0,17 kcal mol⁻¹ na energia de ativação da reação com DEDNPP (Figura 42), respectivamente, em relação ao IMZ. Esse comportamento pode ter origem na hiperconjugação mais efetiva ocasionada pelo par de elétrons não ligantes do NH₂ com o sistema π do anel de IMZ, em comparação à ligação C-H do CH₃. Em contrapartida, o grupo OH elevou em 0,74 kcal mol⁻¹ a barreira reacional de clivagem

do triéster em relação ao IMZ não substituído, indicando que na competição de interações eletrônicas com o anel, o efeito retirador sigma do oxigênio prevalece à sua doação hiperconjugativa, em contraste ao observado com o NH₂. A inclusão do grupo *ip* no IMZ não resultou em maior nucleofilicidade do anel de IMZ, visto que a energia de ativação do 5IPZ foi cerca de 0,53 kcal mol⁻¹ mais alta em relação ao derivado 5MEI, que por sua vez apresenta substituinte menor. Essa observação indica que o aumento do grupo alquílico visando aumentar o efeito indutivo ao IMZ não acarreta em aumento da nucleofilicidade. Cabe ressaltar, todavia, que o 5IP mostrou-se mais reativo que o derivado hidroxilado 5HMZ (Figura 42), indicando que o grupo OH ligado ao metileno diminui a atividade nucleofílica do IMZ, por retirar densidade eletrônica do carbono ligado ao anel. Todos os halogênios (5FZ, 5ClZ, 5BrZ e 5IZ) avaliados reduziram drasticamente a reatividade do IMZ, reiterando a sensibilidade da reatividade do IMZ na presença de grupos desativadores, como mostrado experimentalmente para o grupo nitro no 4NZ (vide supra). A menor barreira reacional dentre os desativadores foi obtida com o derivado 5ClZ, porém ainda 12,8 kcal mol⁻¹ mais alta que a do IMZ.

O substituinte que mais influenciou na reatividade do IMZ foi observado com o OH na posição 2, que levou à redução de 0,72 kcal mol⁻¹ na barreira reacional em relação ao IMZ, considerando ambas as etapas do mecanismo. Esse resultado, como mencionado, tem origem na formação de forte ligação de hidrogênio OH...OP, que proporciona estabilização do ET (Figura 41), levando a formação de um intermediário pentacoordenado. Essa interação, portanto, é prevalecte ao efeito indutivo causado por esse ou outros grupos na posição 5. O grupo amino na posição 2, por sua vez, acarretou na diminuição da nucleofilicidade do derivado 2AZ, comparado ao IMZ, elevando a energia de ativação em 1,32 kcal mol⁻¹. Esse resultado indica que a formação de ligação de hidrogênio do tipo NH...OP é mais fraca, sendo o abaixamento de energia que seria resultante dessa interação é penalizado com impedimento estérico no nitrogênio nucleofílico do IMZ, causado pelo próprio grupo amino (Figura 40).

A utilização de espectroscopia vibracional tem sido uma importante ferramenta na investigação de ligações de hidrogênio intra e intermoleculares em diversos sistemas.¹⁴¹⁻¹⁴³ Assim, as frequências (ν) e intensidades (*I*) de estiramento OH e NH₂, presentes nos ET das reações envolvendo os derivados 4HMZ, 5HMZ,

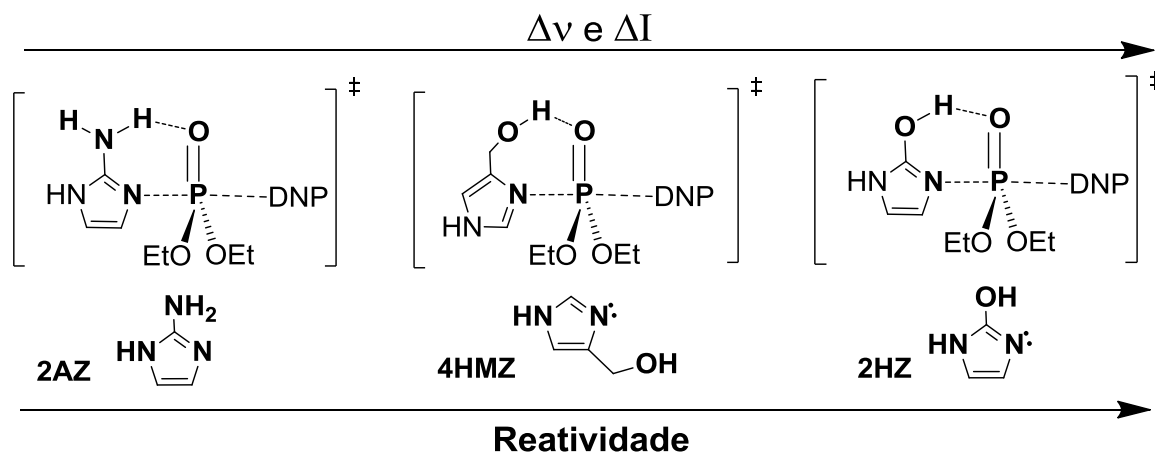
2HZ (nesse caso considerando o ET¹), 2AZ, 5AZ e 5HZ, foram analisadas para averiguar a dependência da força da ligação de hidrogênio com a reatividade desses derivados de IMZ. Os resultados dessa análise vibracional indicam que, nos casos em que os grupos estão suficientemente próximos ao centro nucleofílico do IMZ e, portanto, aptos a formar ligação de hidrogênio com o triéster na estrutura do ET (4HMZ, 2HZ e 2AZ), há o chamado efeito batocrômico. Esse efeito tem relação com o abaixamento da frequência de estiramento OH ou NH₂ acompanhado pelo aumento da intensidade desse modo de vibração, em comparação com aquelas calculadas para os ETs contendo esses substituintes em posição mais distante ao centro nucleofílico (5HMZ, 5HZ e 5AZ). Os resultados estão compilados na Tabela 19. O efeito batocrômico é condizente com a presença de ligação de hidrogênio, que leva ao enfraquecimento da ligação covalente OH ou NH e acarreta na diminuição da frequência do modo vibracional.¹⁴¹ Na tabela 19 também estão mostradas as diferenças nas frequências e intensidades das bandas de estiramento, calculadas para cada par de isômeros de posição. Como pode ser observado, o 2HZ apresentou a maior diferença na intensidade e frequência de estiramento do grupo OH em relação ao seu isômero (5HZ), sugerindo que apresente a ligação de hidrogênio mais forte comparado ao 4HMZ, seguido do 2AZ, sendo esse, por sua vez, o que apresenta a ligação de hidrogênio mais fraca (Tabela 19). De fato, essa ordem está em concordância com a reatividade apresentada por esses derivados, sendo 2HZ>4HMZ>2AZ, como ilustrado na Figura 43, indicando que a ligação de hidrogênio é, de fato, a interação que governa sua reatividade.

Tabela 19. Frequências (ν) e intensidades (I) de estiramento OH/NH₂ (B3LYP/6-31+G(d,p)) nos ETs envolvendo os derivados 2HZ, 5HZ, 4HMZ, 5HMZ, 2AZ e 5AZ em reação com DEDNPP e as variações de frequências ($\Delta\nu$) e intensidades vibracionais (ΔI) entre os ETs com e sem ligação de hidrogênio.

	2HZ ^a	4HMZ	2AZ ^b	5HZ	5HMZ	5AZ ^b
ν (cm ⁻¹)	3171,3	3542,8	3508,5	3790,0	3791,3	3523,9
Intensidade (I) (km mol ⁻¹)	1656,1	815,2	205,57	267,2	91,5	55,9
$\Delta\nu$ (cm ⁻¹)	618,7	248,5	15,4	--	--	--
ΔI (km mol ⁻¹)	1388,9	723,7	149,67	--	--	--

^a considerando o ET¹, ^b modo simétrico.

Figura 43. Ordem de reatividade do 2HZ, 2AZ e 4HMZ em reação com DEDNPP e estruturas dos ET. $\Delta\nu$ e ΔI em relação aos respectivos isômeros de posição.



Além disso, comparando os derivados hidroxilados, a conformação na região do ataque nucleofílico no ET^{2HZ} é mais favorecida, já que a ocorrência da ligação de hidrogênio leva à formação de um anel de 6 membros ($\cdots N=C-O-H\cdots P=O\cdots$, Figura 43), enquanto no ET^{4HMZ} observa-se um anel de 7 membros, devido a presença do grupo extra (metileno), que acarreta num aumento de efeito estérico com a fosforila. Assim, foi possível quantificar a importância da capacidade de formação de ligação de hidrogênio entre o derivado de IMZ e o triéster de fosfato. Essa interação acarreta em aumento da reatividade de derivados de IMZ, consequência observada principalmente no caso do 2HZ, que se mostrou o catalisador mais reativo dentre todos os estudados nesse trabalho, levando a um mecanismo A_N+D_N , diferentemente dos demais que apresentaram caminho A_ND_N .

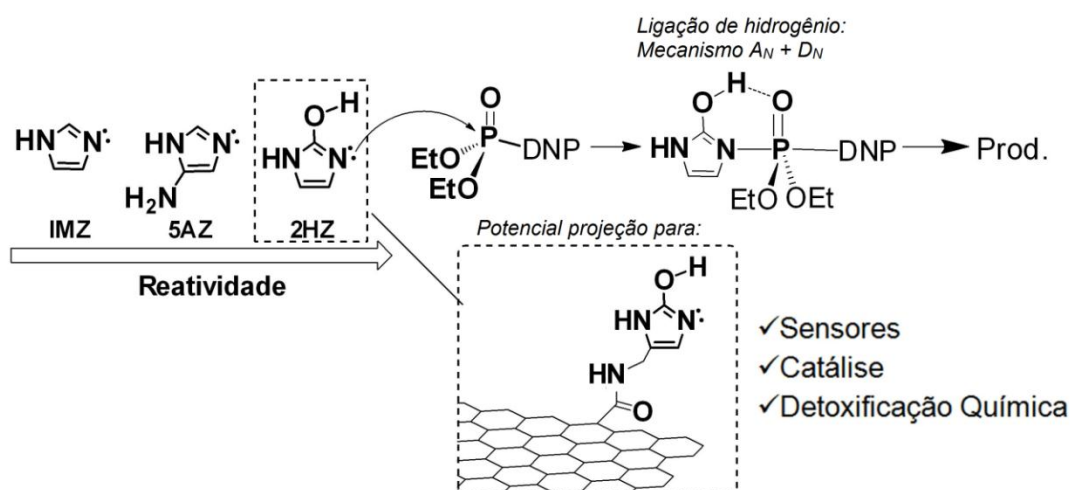
4.5.1. Conclusões Parciais

A aplicação de metodologias de cálculo permitiram avaliar a reatividade de derivados de IMZ, considerando o efeito causado por grupos em posições estratégicas (2 e 5) e as consequências nos mecanismos de reação de transferência do grupo fosforila. Dentre os nove derivados avaliados, os monohalogenados apresentaram as menores reatividades, com substituintes influenciando intensamente no aumento das barreiras de ativação nas reações com o DEDNPP devido ao seu caráter retirador eletrônico. Em contrapartida, as maiores reatividades foram observadas com o 2HZ, devido à formação de uma ligação de hidrogênio

entre o OH e a fosforila na estrutura do ET, e com o 2AZ, pela ativação do anel por efeito indutivo, sendo ambos mais reativos que o IMZ não substituído. Apesar disso, dentre esses dois fatores, a capacidade de formação de ligação de hidrogênio entre o nucleófilo e o éster de fosfato se mostrou preponderante, visto que o 2HZ apresentou a menor barreira de ativação na reação com o triéster, além de ter levado a mudança de mecanismo de concertado, como nos outros casos, para associativo. A doação de ligação de hidrogênio entre o substituinte e a fosforila também foi observada no 4HMZ e 2AZ, como sugerido pela análise vibracional do efeito batocrômico. Porém, essa interação é mais forte no 2HZ, seguido pelo 2AZ e 4HMZ, acompanhando a ordem de reatividade e confirmando sua importância na reatividade dos derivados.

Como ilustrado na Figura 44, cálculos indicam o 2HZ como catalisador monossustituído mais reativo, e os resultados agregam informações acerca da reatividade de derivados de IMZ para estudos futuros, visando à projeção de novos catalisadores, sugerindo principalmente a importância de interações locais com envolvimento do grupo OH. De fato, seja visando aplicações em sensores para monitoramentos de pesticidas ou em processos de funcionalização de materiais,¹⁴⁴ a busca por catalisadores derivados de IMZ com a melhor atividade catalítica é estratégica. Cabe ressaltar, ainda, que a aplicação de métodos teóricos é fundamental, não apenas otimização do trabalho experimental, mas também para permitir acesso a detalhes importantes no tocante à reatividade dos catalisadores.

Figura 44. Derivados de IMZ mais reativos na desfosforilação do DEDNPP e possíveis aplicações.



5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesse trabalho, as reações do triéster DEDNPP com os fármacos ABZ, BNZ, MTZ e MMZ e os derivados 1MEI, 2MEI, 4(5)MEI e 4(5)HMZ foram detalhadamente estudadas, com foco na influência de substituintes. Com a associação de metodologias teórico-experimentais, foi possível elucidar diferentes aspectos de sua reatividade, como as contribuições estéricas e eletrônicas, o antagonismo entre basicidade e nucleofilicidade e a influência do meio, como ilustrado na Figura 45.

O MMZ apresentou surpreendente reatividade com DEDNPP em contraste aos outros medicamentos e, devido ao seu caráter nucleofílico ambidentado, observaram-se caminhos reacionais competitivos. Na forma neutra, o MMZ tem ataque nucleofílico preferencial do nitrogênio ao fósforo, enquanto sua espécie aniônica tende a reagir por mecanismo de substituição nucleofílica aromática pelo enxofre, sendo a reação modulada pelo pH. Pode-se considerar que a sua elevada reatividade pode levar à ocorrência de reações indesejáveis no organismo ou interações medicamentosas, incitando pesquisas específicas nesse sentido.

Os xMEI também apresentaram elevada atividade catalítica na clivagem do DEDNPP, com reatividade correspondente a 4(5)MEI>IMZ>1MEI>2MEI, sendo independente do pK_{aH} . Assim, frente ao seu caráter eletrônico doador, o efeito da metila no IMZ é antagônico. Por análises de RMN, foi possível distinguir a reatividade dos tautômeros do 4(5)MEI, sendo o 5MEI o responsável pela alta nucleofilicidade do par tautomérico e o único xMEI mais reativo que o IMZ. Cálculos teóricos mostraram que a baixa reatividade do 2MEI e 4MEI está ligada ao efeito estérico causado pela metila, enquanto a maior reatividade do 5MEI foi atribuída ao orbital $\sigma_{NL}N$ de alta energia. No estudo do efeito do solvente na reatividade do IMZ e 1MEI, foi mostrado que o IMZ é mais solvatado em meios mais aquosos, por atuar como doador e receptor de ligação de hidrogênio, enquanto o 1MEI atua apenas como receptor. Logo, a menor capacidade de formação de ligação de hidrogênio pelo meio, leva ao aumento na reatividade do IMZ em relação ao 1MEI.

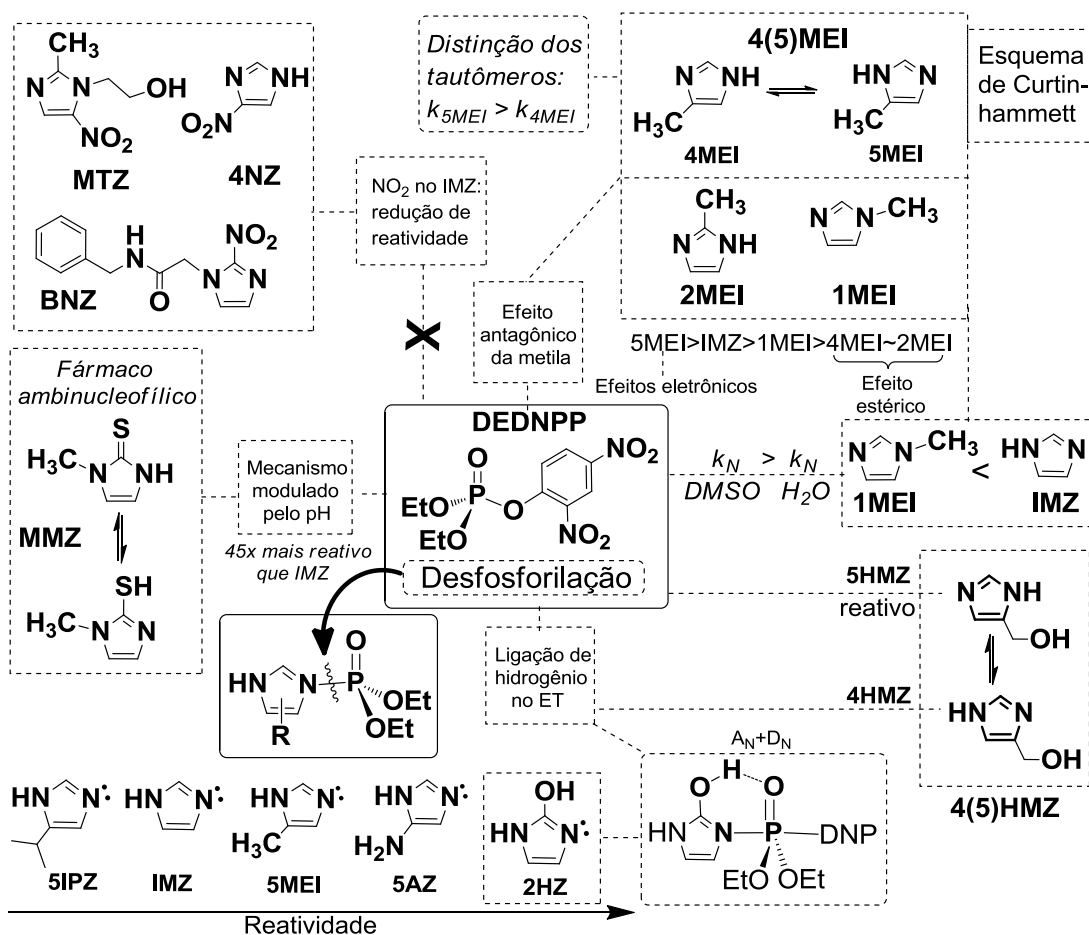
Na reação do 4(5)HMZ com DEDNPP, um intermediário de reação foi detectado por análises por EM e RMN e resultados sugeriram o ataque pelo nitrogênio. Cálculos teóricos mostraram que o ataque nucleofílico do nitrogênio de ambos os tautômeros do 4(5)HMZ tem pouca diferença nas barreiras reacionais, porém é sutilmente menor para o 5HMZ, pela ausência de impedimento estérico. Em

relação ao 5HMZ, a reatividade similar apresentada pelo 4HMZ, é devida a formação de ligação de hidrogênio com a fosforila do DEDNPP na formação do ET, que compensa o efeito estérico causado pelo substituinte.

No desenvolvimento teórico de um catalisador otimizado baseado no IMZ, o catalisador que apresentou maior reatividade foi aquele com OH na posição 2 do anel (2HZ), devido à formação da ligação de hidrogênio entre o substituinte e a fosforila do DEDNPP. Essa interação foi o fator responsável para a formação de um mínimo de estrutura pentacoordenada, reduzindo a barreira de ativação para a clivagem do triéster. Assim, a capacidade de formação de ligação de hidrogênio é um fator importante a se considerar na projeção de catalisadores nucleofílicos.

Os resultados alcançados com esse trabalho podem nortear o desenvolvimento de novos catalisadores para transferência do grupo fosforila, visando a detecção ou detoxificação de pesticidas. Ainda, derivados de IMZ podem ser utilizados para funcionalização de materiais, projeção de sensores ou até mesmo atuando diretamente, via catálise homogênea, na degradação de organofosfatos.

Figura 45. Resumo geral das conclusões desse trabalho.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. HAMANO, H.; HAMEKA, H. F. On the dipole moments and chemical properties of pyrazole and imidazole. **Tetrahedron**, v.18, n.8, p.985. 1962.
2. LENARCIK, B.; OJCZENASZ, P. The influence of the size and position of the alkyl groups in alkylimidazole molecules on their acid-base properties. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, v.39, n.2, p.287. 2002.
3. WALBA, H.; ISENSEE, R. W. Acidity Constants of Some Arylimidazoles and Their Cations. **Journal of Organic Chemistry**, v.26, n.8, p.2789. 1961.
4. MATUSZAK, C. A.; MATUSZAK, A. J. Imidazole - Versatile today, prominent tomorrow. **Journal of Chemical Education**, v.53, n.5, p.280. 1976.
5. JAIN M.K., S. S. C. **Modern Organic Chemistry**. Vishal Publishing Co. 2009. 809 p.
6. KLINGSBERG, E. **The Chemistry of Heterocyclic Compounds. Pyridine and its Derivatives**. American Chemical Society, v.83. 1961. p. (The Chemistry of Heterocyclic Compounds.)
7. ORTH, E. S. **Reações nucleofílicas de desfosforilação com imidazol e hidroxamato: modelagem em sistemas intra- e intermolecular, polimérico e micelar. (Tese de doutorado)**. Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011. 195 p.
8. ANDERSON, L. R.; LIU, K.-C. **Pyrrrole and Pyrrole Derivatives**. John Wiley & Sons, Inc. 2000. p. (Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology)
9. SUNDBERG, R. J.; MARTIN, R. B. Interactions of histidine and other imidazole derivatives with transition metal ions in chemical and biological systems. **Chemical Reviews**, v.74, n.4, p.471. 1974.
10. GREEN, H.; DAY, A. R. The Tautomeric Character of the Imidazole Ring. **Journal of the American Chemical Society**, v.64, n.5, p.1167. 1942.
11. TONG, Y.; BOUSKA, J. J.; ELLIS, P. A.; JOHNSON, E. F.; LEVERSON, J.; LIU, X.; MARCOTTE, P. A.; OLSON, A. M.; OSTERLING, D. J.; PRZYTULINSKA, M.; RODRIGUEZ, L. E.; SHI, Y.; SONI, N.; STAVROPOULOS, J.; THOMAS, S.; DONAWHO, C. K.; FROST, D. J.; LUO, Y.; GIRANDA, V. L.; PENNING, T. D. Synthesis and Evaluation of a New Generation of Orally Efficacious Benzimidazole-

Based Poly(ADP-ribose) Polymerase-1 (PARP-1) Inhibitors as Anticancer Agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.52, n.21, p.6803. 2009.

12. KHRISTICH, B. I. Tautomerism in a number of asymmetrical imidazole systems. **Chemistry of Heterocyclic Compounds**, v.6, n.12, p.1572. 1970.

13. KATRITZKY, A. R.; POZHARSKIĬ, A. F. **Handbook of heterocyclic chemistry**. Amsterdam ; Gainesville, FL: Elsevier. 2000. xxiii p.

14. WORTH, G. A.; KING, P. M.; RICHARDS, W. G. Theoretical calculation of tautomer equilibria in solution: 4-(5-)methylimidazole. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v.993, n.1, p.134. 1989.

15. JOULE, J. A.; MILLS, K. **Heterocyclic chemistry**. Hoboken, N.J.: Wiley. 2009. xxviii p.

16. BERGMANN, E.; PULLMAN, A. **Molecular and Quantum Pharmacology: Proceedings of the Seventh Jerusalem Symposium on Quantum Chemistry and Biochemistry Held in Jerusalem, March 31st–April 4th, 1974**. Springer Science & Business Media, v.7. 2012.

17. CHERMAHINI, A. N.; HOSSEINZADEH, B.; SALIMI BENI, A.; TEIMOURI, A. Theoretical studies on the reactivity of mono-substituted imidazole ligands. **Journal of Structural Chemistry**, v.25, n.2, p.583. 2014.

18. ORTH, E. S.; WANDERLIND, E. H.; MEDEIROS, M.; OLIVEIRA, P. S. M.; VAZ, B. G.; EBERLIN, M. N.; KIRBY, A. J.; NOME, F. Phosphorylimidazole Derivatives: Potentially Biosignaling Molecules. **Journal of Organic Chemistry**, v.76, n.19, p.8003. 2011.

19. BRUCE, T. C.; SCHMIR, G. L. Imidazole Catalysis .1. The Catalysis of the Hydrolysis of Phenyl Acetates by Imidazole. **Journal of the American Chemical Society**, v.79, n.7, p.1663. 1957.

20. NEUVONEN, H. Kinetics and Mechanisms of Reactions of Pyridines and Imidazoles with Phenyl Acetates and Trifluoroacetates in Aqueous Acetonitrile with Low Content of Water - Nucleophilic and General Base Catalysis in Ester Hydrolysis. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2**, n.2, p.159. 1987.

21. RAINES, R. T. Ribonuclease A. **Chemical Reviews**, v.98, n.3, p.1045. 1998.

22. BRESLOW, R.; DONG, S. D.; WEBB, Y.; XU, R. Further studies on the buffer-catalyzed cleavage and isomerization of uridylyridine. Medium and ionic strength effects on catalysis by morpholine, imidazole, and acetate buffers help clarify the mechanisms involved and their relationship to the mechanism used by the enzyme ribonuclease and by a ribonuclease mimic. **Journal of the American Chemical Society**, v.118, n.28, p.6588. 1996.
23. HERSCHLAG, D. Ribonuclease Revisited: Catalysis via the Classical General Acid-Base Mechanism or a Triester-like Mechanism? **Journal of the American Chemical Society**, v.116, n.26, p.11631. 1994.
24. SOWA, G. A.; HENGGE, A. C.; CLELAND, W. W. ¹⁸O Isotope Effects Support a Concerted Mechanism for Ribonuclease A. **Journal of the American Chemical Society**, v.119, n.9, p.2319. 1997.
25. PICCIOTTO, MARINA R.; HIGLEY, MICHAEL J.; MINEUR, YANN S. Acetylcholine as a Neuromodulator: Cholinergic Signaling Shapes Nervous System Function and Behavior. **Neuron**, v.76, n.1, p.116. 2012.
26. QUINN, D. M. Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition states. **Chemical Reviews**, v.87, n.5, p.955. 1987.
27. GOODMAN, L. S.; GILMAN, A.; BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. **Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. New York: McGraw-Hill. 2006.
28. BHATNAGAR A., S. P. K., KUMAR N. A Review on "Imidazoles": Their Chemistry and Pharmacological Potentials. **International Journal of ChemTech Research**, v.3, n.1, p.15. 2011.
29. KYRIDES, L. P.; ZIENTY, F. B.; STEAHLY, G. W.; MORRILL, H. L. Substituted Imidazoles and 2-Imidazolines. **Journal of Organic Chemistry**, v.12, n.4, p.577. 1947.
30. BYWATER, W. G.; MCGINTY, D. A.; JENESEL, N. D. Antithyroid Studies .2. The Goitrogenic Activity of Some Imidazoles and Benzimidazoles. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.85, n.1, p.14. 1945.
31. ALMIRANT.L; MUGNAINI, A.; RUGARLI, P.; GAMBA, A.; ZEFELIPP.E; DETOMA, N.; MURMANN, W. Derivatives of Imidazole .3. Synthesis and Pharmacological Activities of Nitriles Amides and Carboxylic Acid Derivatives of Imidazo(1,2-a)Pyridine. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.12, n.1, p.122. 1969.

32. ALMIRANT.L; POLO, L.; MUGNAINI, A.; PROVINCIE; RUGARLI, P.; BIANCOTT.A; GAMBA, A.; MURMANN, W. Derivatives of Imidazole .1. Synthesis and Reactions of Imidazo[1,2-a]Pyridienes with Analgesic Antiinflammatory Antipyretic and Anticonvulsant Activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.8, n.3, p.305. 1965.
33. ALMIRANT.L; POLO, L.; MUGNAINI, A.; PROVINCIE; RUGARLI, P.; GAMBA, A.; OLIVI, A.; MURMANN, W. Derivatives of Imidazole .2. Synthesis and Reactions of Imidazo[1,2-a]Pyrimidines and Other Bi- and Tricyclic Imidazo Derivatives with Analgesic Antiinflammatory Antipyretic and Anticonvulsant Activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.9, n.1, p.29. 1966.
34. GOODMAN, L. S., GILMAN A. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. Mexico: McGraw-Hill. 1996.
35. SÁNCHEZ-MARTÍNEZ, C.; GELBERT, L. M.; LALLENA, M. J.; DE DIOS, A. Cyclin dependent kinase (CDK) inhibitors as anticancer drugs. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.25, n.17, p.3420. 2015.
36. FINLAY, M. R. V.; ACTON, D. G.; ANDREWS, D. M.; BARKER, A. J.; DENNIS, M.; FISHER, E.; GRAHAM, M. A.; GREEN, C. P.; HEATON, D. W.; KAROUTCHI, G.; LODDICK, S. A.; MORGENTIN, R.; ROBERTS, A.; TUCKER, J. A.; WEIR, H. M. Imidazole piperazines: SAR and development of a potent class of cyclin-dependent kinase inhibitors with a novel binding mode. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.18, n.15, p.4442. 2008.
37. ZAHOOR, A.; LAFLEUR, M. V. M.; KNIGHT, R. C.; LOMAN, H.; EDWARDS, D. I. DNA Damage Induced by Reduced Nitroimidazole Drugs. **Biochemical Pharmacology**, v.36, n.19, p.3299. 1987.
38. POLI, P.; DE MELLO, M. A.; BUSCHINI, A.; MORTARA, R. A.; DE ALBUQUERQUE, C. N.; DA SILVA, S.; ROSSI, C.; ZUCCHI, T. M. A. D. Cytotoxic and genotoxic effects of megazol, an anti-Chagas' disease drug, assessed by different short-term tests. **Biochemical Pharmacology**, v.64, n.11, p.1617. 2002.
39. RUSTIA, M.; SHUBIK, P. Induction of Lung Tumors and Malignant Lymphomas in Mice by Metronidazole². **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v.48, n.3, p.721. 1972.
40. VIODE, C.; BETTACHE, N.; CENAS, N.; KRAUTH-SIEGEL, R.; CHAUVIERE, G.; BAKALARA, N.; PERIE, J. Enzymatic reduction studies of nitroheterocycles. **Biochemical Pharmacology**, v.57, n.5, p.549. 1999.

41. WESTHEIMER, F. H. Why Nature Chose Phosphates. **Science**, v.235, n.4793, p.1173. 1987.
42. DUGAS, H. **Bioorganic Chemistry: A Chemical Approach to Enzyme Action**. New York: VCH. 1996. 700
43. SAENGER, W. **Principles of Nucleic Acid Structure**. New York: Springer. 1984. 556 p.
44. WESTHEIMER, F. **The Role of Phosphorus in Chemistry and Biochemistry**. ACS Publications. 1992.
45. COX, J. R.; RAMSAY, O. B. Mechanisms of Nucleophilic Substitution in Phosphate Esters. **Chemical Reviews**, v.64, n.4, p.317. 1964.
46. WOLFENDEN, R. Degrees of difficulty of water-consuming reactions in the absence of enzymes. **Chemical Reviews**, v.106, n.8, p.3379. 2006.
47. SOLTANINEJAD, K.; SHADNIA, S. **History of the Use and Epidemiology of Organophosphorus Poisoning**. London: Springer London. 2014. 25 p. (Basic and Clinical Toxicology of Organophosphorus Compounds)
48. YANG, Y. C.; BAKER, J. A.; WARD, J. R. Decontamination of Chemical Warfare Agents. **Chemical Reviews**, v.92, n.8, p.1729. 1992.
49. DOMINGOS, J. B.; LONGHINOTTI, E.; MACHADO, V. G.; NOME, F. The chemistry of phosphate esters. **Quimica Nova**, v.26, n.5, p.745. 2003.
50. DELFINO, R. T.; RIBEIRO, T. S.; FIGUEROA-VILLAR, J. D. Organophosphorus compounds as chemical warfare agents: a review. **Journal of the Brazilian Computer Society**, v.20, p.407. 2009.
51. CASIDA, J. E.; QUISTAD, G. B. Serine hydrolase targets of organophosphorus toxicants. **Chemico-Biological Interactions**, v.157–158, p.277. 2005.
52. CHAN J.T.S. , Y. R. S. D., TANG S. Y. H. An overview of chemical warfare agents. **Hong Kong Journal of Emergency Medicine**, v.9, n.1. 2002.
53. WIENER, S. W.; HOFFMAN, R. S. Nerve Agents: A Comprehensive Review. **Journal of Intensive Care Medicine**, v.19, n.1, p.22. 2004.

54. LEIKIN, J. B.; THOMAS, R. G.; WALTER, F. G.; KLEIN, R.; MEISLIN, H. W. A review of nerve agent exposure for the critical care physician*. **Critical Care Medicine**, v.30, n.10, p.2346. 2002.
55. WOREK, F.; THIERMANN, H.; SZINICZ, L.; EYER, P. Kinetic analysis of interactions between human acetylcholinesterase, structurally different organophosphorus compounds and oximes. **Biochemical Pharmacology**, v.68, n.11, p.2237. 2004.
56. WANG, J.; GU, J.; LESZCZYNSKI, J. Phosphonylation mechanisms of sarin and acetylcholinesterase: a model DFT study. **The Journal of Physical Chemistry B**, v.110, n.14, p.7567. 2006.
57. TARKKA, R. M.; BUNCEL, E. Origin of the Bell-Shaped α -Effect-Solvent Composition Plots. α -Effect-Solvent Dependence of the α -Effect at a Phosphorus Center. **Journal of the American Chemical Society**, v.117, n.5, p.1503. 1995.
58. MAZZACURATI, M. **Advanced Studies on the Synthesis of Organophosphorus Compounds** Dipartimento di Chimica Organica UNIVERSITÀ DI BOLOGNA, Bolonha, 2007.
59. SANTOS, V. M. R. D.; DONNICI, C. L.; DACOSTA, J. B. N.; CAIXEIRO, J. M. R. Compostos organofosforados pentavalentes: histórico, métodos sintéticos de preparação e aplicações como inseticidas e agentes antitumorais. **Química Nova**, v.30, p.159. 2007.
60. CARNEIRO, F. F.; PIGNATI, W.; RIGOTTO, R. M.; AUGUSTO, L. G. S.; RIZOLLO, A.; MULLER, N. M.; ALEXANDRE, V. P.; FRIEDRICH, K.; C., M. M. S. **Dossiê, ABRASCO, Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. Parte 2 - Agrotóxicos, Saúde e Sustentabilidade.** Rio de Janeiro: EPSJV; São Paulo: Expressão Popular. 2012.
61. DICH, J.; ZAHM, S. H.; HANBERG, A.; ADAMI, H.-O. Pesticides and cancer. **Cancer Causes & Control**, v.8, n.3, p.420. 1997.
62. **Public health impact of pesticides used in agriculture.** Geneva. 1990. p. (World Health Organization)
63. CARNEIRO, F. F.; PIGNATI, W.; RIGOTTO, R. M.; AUGUSTO, L. G. S.; RIZOLLO, A.; MULLER, N. M.; ALEXANDRE, V. P.; FRIEDRICH, K.; C., M. M. S. **Dossiê ABRASCO, Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde.**

Parte 1 - Agrotóxicos, segurança alimentar e nutricional e saúde. Rio de Janeiro: EPSJV; São Paulo: Expressão Popular. 2012.

64. PIGNATI, W.; OLIVEIRA, N. P.; SILVA, A. M. C. D. Vigilância aos agrotóxicos: quantificação do uso e previsão de impactos na saúde-trabalho-ambiente para os municípios brasileiros. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.12, n.19, p.4669. 2014.

65. KIRBY, A. J.; MEDEIROS, M.; OLIVEIRA, P. S. M.; ORTH, E. S.; BRANDAO, T. A. S.; WANDERLIND, E. H.; AMER, A.; WILLIAMS, N. H.; NOME, F. Activating Water: Important Effects of Non-leaving Groups on the Hydrolysis of Phosphate Triesters. **Chemistry - A European Journal**, v.17, n.52, p.14996. 2011.

66. MORA, J. R.; KIRBY, A. J.; NOME, F. Theoretical Study of the Importance of the Spectator Groups on the Hydrolysis of Phosphate Triesters. **Journal of Organic Chemistry**, v.77, n.16, p.7061. 2012.

67. FLORIÁN, J.; WARSHEL, A. Phosphate Ester Hydrolysis in Aqueous Solution: Associative versus Dissociative Mechanisms. **Journal of Physical Chemistry B**, v.102, n.4, p.719. 1998.

68. DUARTE, F.; BARROZO, A.; ÅQVIST, J.; WILLIAMS, N. H.; KAMERLIN, S. C. L. The Competing Mechanisms of Phosphate Monoester Dianion Hydrolysis. **Journal of the American Chemical Society**, v.138, n.33, p.10664. 2016.

69. DUARTE, F.; AQVIST, J.; WILIAMS, N. H.; KAMERLIN, S. C. L. Resolving Apparent Conflicts between Theoretical and Experimental Models of Phosphate Monoester Hydrolysis. **Journal of the American Chemical Society**, v.137, n.3, p.1081. 2015.

70. BLUMENTHAL, E.; HERBERT, J. The mechanism of the hydrolysis of trimethyl orthophosphate. **Transactions of the Faraday Society**, v.41, p.611. 1945.

71. BUNTON, C.; MHALA, M.; OLDHAM, K.; VERNON, C. 660. The reactions of organic phosphates. Part III. The hydrolysis of dimethyl phosphate. **Journal of the Chemical Society (Resumed)**, p.3293. 1960.

72. KIRBY, A. J.; NOME, F. Fundamentals of Phosphate Transfer. **Accounts of Chemical Research**, v.48, n.7, p.1806. 2015.

73. KIRBY, A. J.; MORA, J. R.; NOME, F. New light on phosphate transfer from triesters. **Bba-Proteins Proteom**, v.1834, n.1, p.454. 2013.

74. KHAN, S.; KIRBY, A. The reactivity of phosphate esters. Multiple structure–reactivity correlations for the reactions of triesters with nucleophiles. **Journal of the Chemical Society B: Physical Organic**, p.1172. 1970.
75. RUBEN, E. A.; PLUMLEY, J. A.; CHAPMAN, M. S.; EVANSECK, J. D. Anomeric Effect in “High Energy” Phosphate Bonds. Selective Destabilization of the Scissile Bond and Modulation of the Exothermicity of Hydrolysis. **Journal of the American Chemical Society**, v.130, n.11, p.3349. 2008.
76. DOMINGOS, J. B.; LONGHINOTTI, E.; BUNTON, C. A.; NOME, F. Reactions of bis (2, 4-dinitrophenyl) phosphate with hydroxylamine. **The Journal of Organic Chemistry**, v.68, n.18, p.7051. 2003.
77. REN, Y.; YAMATAKA, H. The α -Effect in Gas-Phase SN2 Reactions: Existence and the Origin of the Effect. **The Journal of Organic Chemistry**, v.72, n.15, p.5660. 2007.
78. MANFREDI, A. M. **Desfosforilação do dietil-2,4-dinitrofenil fosfato e do pesticida paraoxon metílico por oximas: reações em meio aquoso e catálise micelar**. Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016. p.
79. DOMINGOS, J. B.; LONGHINOTTI, E.; BRANDAO, T. A.; BUNTON, C. A.; SANTOS, L. S.; EBERLIN, M. N.; NOME, F. Mechanisms of nucleophilic substitution reactions of methylated hydroxylamines with bis (2, 4-dinitrophenyl) phosphate. Mass spectrometric identification of key intermediates. **The Journal of Organic Chemistry**, v.69, n.18, p.6024. 2004.
80. ORTH, E. S.; DA SILVA, P. L. F.; MELLO, R. S.; BUNTON, C. A.; MILAGRE, H. M. S.; EBERLIN, M. N.; FIEDLER, H. D.; NOME, F. Suicide Nucleophilic Attack: Reactions of Benzohydroxamate Anion with Bis(2,4-dinitrophenyl) Phosphate. **Journal of Organic Chemistry**, v.74, n.14, p.5011. 2009.
81. MEDEIROS, M. **Estudo mecanístico da reação entre hidroxilamina e um triéster de fosfato: caracterização de produtos e intermediários**. Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis-SC, 2009.
82. KHAN, S.; KIRBY, A.; WAKSELMAN, M.; HORNING, D.; LAWLOR, J. Intramolecular catalysis of phosphate diester hydrolysis. Nucleophilic catalysis by the neighbouring carboxy-group of the hydrolysis of aryl 2-carboxyphenyl phosphates. **Journal of the Chemical Society B: Physical Organic**, p.1182. 1970.

83. CASTRO, E. A.; UGARTE, D.; ROJAS, M. F.; PAVEZ, P.; SANTOS, J. G. Nucleophilic substitution reactions of diethyl 4-nitrophenyl phosphate triester: Kinetics and mechanism. **International Journal of Chemical Kinetics**, v.43, n.12, p.708. 2011.
84. WAGNERJAUREGG, T.; HACKLEY, B. E. Model Reactions of Phosphorus-Containing Enzyme Inactivators .3. Interaction of Imidazole, Pyridine and Some of Their Derivatives with Dialkyl Halogeno-Phosphates. **Journal of the American Chemical Society**, v.75, n.9, p.2125. 1953.
85. BORDEN, W. T. Current Applications of Computational Chemistry in JACS-Molecules, Mechanisms, and Materials. **Journal of the American Chemical Society**, v.133, p.14841. 2011.
86. LEVINE, I. N.; BUSCH, D. H.; SHULL, H. **Quantum chemistry**. Pearson Prentice Hall Upper Saddle River, NJ, v.6. 2009.
87. MCQUARRIE, D. A. **Physical chemistry : a molecular approach**. Sausalito, Calif. : University Science Books, 1997.
88. ANSLYN, E. V.; DOUGHERTY, D. A. **Modern physical organic chemistry**. Sausalito, CA: University Science. 2006. xxviii
89. LEE, C.; YANG, W.; PARR, R. G. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. **Physical review B**, v.37, n.2, p.785. 1988.
90. BECKE, A. D. A new mixing of Hartree–Fock and local density-functional theories. **The Journal of chemical physics**, v.98, n.2, p.1372. 1993.
91. ZHAO, Y.; TRUHLAR, D. G. The M06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states, and transition elements: two new functionals and systematic testing of four M06-class functionals and 12 other functionals. **Theoretical Chemistry Accounts**, v.120, n.1-3, p.215. 2008.
92. DITCHFIELD, R.; HEHRE, W. J.; POPLE, J. A. Self-consistent molecular-orbital methods. IX. An extended Gaussian-type basis for molecular-orbital studies of organic molecules. **The Journal of chemical physics**, v.54, n.2, p.724. 1971.
93. COHEN, A. J.; MORI-SÁNCHEZ, P.; YANG, W. Challenges for density functional theory. **Chemical Reviews**, v.112, n.1, p.289. 2011.

94. ARANTES, G. M.; CHAIMOVICH, H. Thiolysis and alcoholysis of phosphate tri- and monoesters with alkyl and aryl leaving groups. An ab initio study in the gas phase. **The Journal of Physical Chemistry A**, v.109, n.25, p.5625. 2005.
95. MENEGON, G.; LOOS, M.; CHAIMOVICH, H. Ab initio study of the thiolysis of trimethyl phosphate ester in the gas phase. **The Journal of Physical Chemistry A**, v.106, n.39, p.9078. 2002.
96. AOYAMA, H.; SILVA, T. M. A.; MIRANDA, M. A.; FERREIRA, C. V. Proteínas tirosina fosfatases: propriedades e funções biológicas. **Química Nova**, v.26, p.896. 2003.
97. KIRBY, A. J.; SOUZA, B. S.; MEDEIROS, M.; PRIEBE, J. P.; MANFREDI, A. M.; NOME, F. Hydroxylamine as an oxygen nucleophile. Chemical evidence from its reaction with a phosphate triester. **Chemical Communications**, n.37, p.4428. 2008.
98. KIRBY, A. J.; DAVIES, J. E.; BRANDÃO, T. A. S.; DA SILVA, P. F.; ROCHA, W. R.; NOME, F. Hydroxylamine as an Oxygen Nucleophile. Structure and Reactivity of Ammonia Oxide. **Journal of the American Chemical Society**, v.128, n.38, p.12374. 2006.
99. JENCKS, W. P. The Reaction of Hydroxylamine with Activated Acyl Groups. I. Formation of O-Acylhydroxylamine. **Journal of the American Chemical Society**, v.80, n.17, p.4581. 1958.
100. MEDEIROS, M.; WANDERLIND, E. H.; MORA, J. R.; MOREIRA, R.; KIRBY, A. J.; NOME, F. Major mechanistic differences between the reactions of hydroxylamine with phosphate di- and tri-esters. **Organic & biomolecular chemistry**, v.11, n.37, p.6272. 2013.
101. ORTH, E. S. **Catálise intramolecular bifuncional em um diéster de fosfato: modelando o mecanismo da ribonuclease**. Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis-SC, 2008. p.
102. ORTH, E. S.; BRANDAO, T. A. S.; SOUZA, B. S.; PLIEGO, J. R.; VAZ, B. G.; EBERLIN, M. N.; KIRBY, A. J.; NOME, F. Intramolecular Catalysis of Phosphodiester Hydrolysis by Two Imidazoles. **Journal of the American Chemical Society**, v.132, n.24, p.8513. 2010.
103. NGUYEN, Q. N. N.; LODWYK, M. W.; BEZER, S.; GAGNÉ, M. R.; WATERS, M. L.; TANTILLO, D. J. Effects of Helix Macrodipole and Local Interactions on

Catalysis of Acyl Transfer by α -Helical Peptides. **ACS Catalysis**, v.5, n.3, p.1617. 2015.

104. KIRBY, A. J.; VARVOGLIS, A. G. The Reactivity of Phosphate Esters. Monoester Hydrolysis. **Journal of the American Chemical Society**, v.89, n.2, p.415. 1967.

105. MOSS, R. A.; IHARA, Y. Cleavage of Phosphate-Esters by Hydroxyl-Functionalized Micellar and Vesicular Reagents. **Journal of Organic Chemistry**, v.48, n.4, p.588. 1983.

106. FRISCH, M. J.; TRUCKS, G. W.; SCHLEGEL, H. B.; SCUSERIA, G. E.; ROBB, M. A.; CHEESEMAN, J. R.; SCALMANI, G.; BARONE, V.; MENNUCCI, B.; PETERSSON, G. A.; NAKATSUJI, H.; CARICATO, M.; LI, X.; HRATCHIAN, H. P.; IZMAYLOV, A. F.; BLOINO, J.; ZHENG, G.; SONNENBERG, J. L.; HADA, M.; EHARA, M.; TOYOTA, K.; FUKUDA, R.; HASEGAWA, J.; ISHIDA, M.; NAKAJIMA, T.; HONDA, Y.; KITAO, O.; NAKAI, H.; VREVEN, T.; MONTGOMERY JR., J. A.; PERALTA, J. E.; OGLIARO, F.; BEARPARK, M. J.; HEYD, J.; BROTHERS, E. N.; KUDIN, K. N.; STAROVEROV, V. N.; KEITH, T.; KOBAYASHI, R.; NORMAND, J.; RAGHAVACHARI, K.; RENDELL, A. P.; BURANT, J. C.; IYENGAR, S. S.; TOMASI, J.; COSSI, M.; REGA, N.; MILLAM, N. J.; KLENE, M.; KNOX, J. E.; CROSS, J. B.; BAKKEN, V.; ADAMO, C.; JARAMILLO, J.; GOMPERS, R.; STRATMANN, R. E.; YAZYEV, O.; AUSTIN, A. J.; CAMMI, R.; POMELLI, C.; OCHTERSKI, J. W.; MARTIN, R. L.; MOROKUMA, K.; ZAKRZEWSKI, V. G.; VOTH, G. A.; SALVADOR, P.; DANNENBERG, J. J.; DAPPRICH, S.; DANIELS, A. D.; FARKAS, Ö.; FORESMAN, J. B.; ORTIZ, J. V.; CIOSLOWSKI, J.; FOX, D. J.; Gaussian, Inc.: Wallingford, CT, USA, 2010.

107. TOMASI, J.; MENNUCCI, B.; CAMMI, R. Quantum mechanical continuum solvation models. **Chemical Reviews**, v.105, n.8, p.2999. 2005.

108. MARENICH, A. V.; CRAMER, C. J.; TRUHLAR, D. G. Universal Solvation Model Based on Solute Electron Density and on a Continuum Model of the Solvent Defined by the Bulk Dielectric Constant and Atomic Surface Tensions. **Journal of Physical Chemistry B**, v.113, n.18, p.6378. 2009.

109. . Spartan'10 (Wavefunction, Ind.: Irvine, CA, USA 2010).

110. PENG, C.; BERNHARD SCHLEGEL, H. Combining Synchronous Transit and Quasi-Newton Methods to Find Transition States. **Israel Journal of Chemistry**, v.33, n.4, p.449. 1993.

111. FUKUI, K. The Path of Chemical-Reactions - the Irc Approach. **Accounts of Chemical Research**, v.14, n.12, p.363. 1981.

112. LEGAULT, C. CYLview, 1.0 b, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, 2009. URL <http://www.cylview.org> (accessado em 27 de março de 2017).
113. ORTH, E. S.; ALMEIDA, T. G.; SILVA, V. B.; OLIVEIRA, A. R. M.; OCAMPOS, F. M. M.; BARISON, A. Mechanistic insight on the catalytic detoxification of Paraoxon mediated by imidazole: Furnishing optimum scaffolds for scavenging organophosphorus agents. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v.403, p.93. 2015.
114. CVIJANOVIĆ, D.; DAMJANOVIĆ, V.; PICEK, I.; FORETIĆ, B. Spectroscopic studies of methimazole reactivity toward the aquapentacyanoferrate (II) ion in aqueous solutions. **Journal of Spectroscopy**, v.27, n.5-6, p.509. 2012.
115. ABRAMOV, N. D.; TRZHTSINSKAYA, B. V. Structure and properties of imidazole-2-thiones (review). **Chemistry of Heterocyclic Compounds**, v.24, n.12, p.1309. 1988.
116. ATTWOOD, P. V.; PIGGOTT, M. J.; ZU, X. L.; BESANT, P. G. Focus on phosphohistidine. **Amino Acids**, v.32, n.1, p.145. 2007.
117. CLAYDEN, J.; GREEVES, N.; WARREN, S. G. **Organic chemistry**. Oxford ; New York: Oxford University Press. 2012. xxv p.
118. MONTANARI, S.; PARADISI, C.; SCORRANO, G. Thiol anions in nucleophilic aromatic substitution reactions with activated aryl halides. Attack on carbon vs attack on halogen. **Journal of Organic Chemistry**, v.58, n.21, p.5628. 1993.
119. MANDAL, B.; BASU, B. Recent advances in S-S bond formation. **Rsc Advances**, v.4, n.27, p.13854. 2014.
120. WANDERLIND, E. H. **Cinética e mecanismo de hidrólise do triéster dietil 2,4-dinitrofenil fosfato**. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014. p.
121. KIRBY, A. J.; YOUNAS, M. The reactivity of phosphate esters. Reactions of diesters with nucleophiles. **Journal of the Chemical Society B: Physical Organic**, n.0, p.1165. 1970.
122. JENCKS, W. P.; CARRIUOLO, J. Imidazole Catalysis .2. Acyl Transfer and the Reactions of Acetyl Imidazole with Water and Oxygen Anions. **Journal of Biological Chemistry**, v.234, n.5, p.1272. 1959.

123. CAPLOW, M.; JENCKS, W. P. Effect of Substituents on Deacylation of Benzoyl-Chymotrypsins. **Biochemistry-U.S.**, v.1, n.5, p.883. 1962.
124. KIRSCH, J. F.; JENCKS, W. P. Nonlinear Structure-Reactivity Correlations . Imidazole-Catalyzed Hydrolysis of Esters. **Journal of the American Chemical Society**, v.86, n.5, p.837. 1964.
125. OAKENFUL.DG; JENCKS, W. P. Reactions of Acetylimidazole and Acetylimidazolium Ion with Nucleophilic Reagents - Structure-Reactivity Relationships. **Journal of the American Chemical Society**, v.93, n.1, p.178. 1971.
126. NEUVONEN, H. Effect of the Acyl Group in the Reaction of Imidazole with Acyl-Substituted 4-Nitrophenyl Acetates in Acetonitrile and in Aqueous Acetonitrile with a Low Water-Content. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2**, n.5, p.951. 1995.
127. LI, L.; LELYVELD, V. S.; PRYWES, N.; SZOSTAK, J. W. Experimental and Computational Evidence for a Loose Transition State in Phosphoroimidazolid Hydrolysis. **Journal of the American Chemical Society**. 2016.
128. KEELER, J.; WOTHERS, P. **Chemical structure and reactivity : an integrated approach**. Oxford ; New York: Oxford University Press. 2008. xviii p.
129. LI, G. S.; RUIZLOPEZ, M. F.; MAIGRET, B. Ab initio study of 4(5)-methylimidazole in aqueous solution. **Journal of Physical Chemistry A**, v.101, n.42, p.7885. 1997.
130. EVERY, H. A.; ZAWODZINSKI JR, T. A. Substituted Imidazoles as Proton Transport Facilitators in Fuel Cell Membranes. Proton Conducting Membrane Fuel Cells IV: Proceedings of the International Symposium. The Electrochemical Society. 2006. 277 p.
131. GAGLIANO JR, R. A.; KNOWLTON, R. C.; BYERS, L. D. Methylimidazole-catalyzed ester hydrolysis: nonlinear kinetics. **The Journal of Organic Chemistry**, v.54, n.22, p.5247. 1989.
132. CATALAN, J.; DIAZ, C.; GARCIA-BLANCO, F. Characterization of binary solvent mixtures of DMSO with water and other cosolvents. **Journal of Organic Chemistry**, v.66, n.17, p.5846. 2001.

133. GOMEZ-TAGLE, P.; VARGAS-ZUNIGA, I.; TARAN, O.; YATSIMIRSKY, A. K. Solvent effects and alkali metal ion catalysis in phosphodiester hydrolysis. **Journal of Organic Chemistry**, v.71, n.26, p.9713. 2006.
134. WONG, D. B.; SOKOLOWSKY, K. P.; EL-BARGHOUTHY, M. I.; FENN, E. E.; GIAMMANCO, C. H.; STURLAUGSON, A. L.; FAYER, M. D. Water Dynamics in Water/DMSO Binary Mixtures. **Journal of Physical Chemistry B**, v.116, n.18, p.5479. 2012.
135. MILLER, R. G. **Beyond ANOVA, basics of applied statistics**. New York: Wiley. 1986. xiii p. (Wiley series in probability and mathematical statistics Applied probability)
136. MILLÁN, D.; SANTOS, J. G.; CASTRO, E. A. Kinetic study of solvent effects on the aminolysis of O-ethyl S-aryl dithiocarbonates. **Journal of Physical Organic Chemistry**, v.25, n.11, p.989. 2012.
137. LU, Z. J.; MANIAS, E.; MACDONALD, D. D.; LANAGAN, M. Dielectric Relaxation in Dimethyl Sulfoxide/Water Mixtures Studied by Microwave Dielectric Relaxation Spectroscopy. **Journal of Physical Chemistry A**, v.113, n.44, p.12207. 2009.
138. KATRITZKY, A. R.; REES, C. W. **Comprehensive heterocyclic chemistry : the structure, reactions, synthesis, and uses of heterocyclic compounds**. Oxford Oxfordshire ; New York: Pergamon Press. 1984. p.
139. QUIN, L. D.; WILLIAMS, A. J. **Practical interpretation of P-31 NMR spectra and computer assisted structure verification**. Advanced Chemistry Development Toronto. 2004. p.
140. CLELAND, W. W.; FREY, P. A.; GERLT, J. A. The Low Barrier Hydrogen Bond in Enzymatic Catalysis. **Journal of Biological Chemistry**, v.273, n.40, p.25529. 1998.
141. YANG, Y. Theoretical study of the SH...O blue-shifted hydrogen bond. **International Journal of Quantum Chemistry**, v.109, n.2, p.266. 2009.
142. QIAN, W.; KRIMM, S. Vibrational Spectroscopy of Hydrogen Bonding: Origin of the Different Behavior of the C-H...O Hydrogen Bond. **The Journal of Physical Chemistry A**, v.106, n.28, p.6628. 2002.

143. GU, Y.; KAR, T.; SCHEINER, S. Fundamental Properties of the CH...O Interaction: Is It a True Hydrogen Bond? **Journal of the American Chemical Society**, v.121, n.40, p.9411. 1999.

144. ORTH, E. S.; FONSACA, J. E. S.; ALMEIDA, T. G.; DOMINGUES, S. H.; FERREIRA, J. G. L.; ZARBIN, A. J. G. Functionalized graphene oxide as a nanocatalyst in dephosphorylation reactions: pursuing artificial enzymes. **Chemical Communications**, v.50, n.69, p.9891. 2014.

APÊNDICE

A. Dados experimentais	166
Tabela A.1. Dados de perfil de pH (k_1 vs pH) para reação do MMZ a $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ com DEDNPP a 25°C	166
Tabela A.2. Dados de perfil de pH (k_{obs} versus pH) para reação do 1MEI, 2MEI e 4(5)MEI a $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ com DEDNPP a 25°C	166
Tabela A.3. Dados cinéticos (k_{obs}) da reação de solvólise do DEDNPP e das reações do IMZ e 1MEI com DEDNPP em cada fração molar da mistura DMSO/ H_2O a 25°C	167
Tabela A.4. Dados de perfil de pH (k_{obs} versus pH) para reação do 4(5)HMZ a $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ com DEDNPP a 25°C	167
Figura A.1. A. Plot de Eyring da reação do DEDNPP ($3,75 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) com MMZ ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$). B. Perfil de concentração da reação do DEDNPP ($3,75 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) com MMZ.	168
Figura A.2. Plots de Eyring das reações do 4(5)HMZ ($0,2 \text{ mol L}^{-1}$) e xMEI ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$) com DEDNPP ($3,75 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$).	168
Figura A.3. Expansão dos espectros de RMN de ^1H (600 MHz) do DEDNPP ($1,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) e 1MEI ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) puros, mostrando a faixa de 9,0 a 6,6 ppm, em pH 8,5 e 25°C	169
Figura A.4. Expansão dos espectros de RMN de ^1H (600 MHz) do DEDNPP ($1,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) e 1MEI ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) puros, mostrando a faixa de 4,5 a 1,2 ppm, em pH 8,5 e 25°C	169
Figura A.5. Espectros de RMN de ^1H para a reação do DEDNPP ($7,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) com 2MEI ($0,3 \text{ mol L}^{-1}$), 25% de D_2O , pH 8,5 e 25°C	170
Figura A.6. Espectros de RMN de ^1H para a reação do DEDNPP ($7,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) com 4(5)MEI ($0,04 \text{ mol L}^{-1}$), 25% de D_2O , pH 8,5 e 25°C	170
Figura A.7. Mapa de correlação direta ^1H - ^{13}C da reação do DEDNPP ($7,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) com 1MEI ($0,3 \text{ mol L}^{-1}$).	171
Figura A.8. Expansão do mapa de correlação direta ^1H - ^{13}C enfatizando as correlações dos núcleos de hidrogênio aromáticos na reação do DEDNPP ($7,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) com 1MEI ($0,3 \text{ mol L}^{-1}$).	171
Figura A.9. Expansão do mapa de correlação direta ^1H - ^{13}C enfatizando as correlações dos grupos etila na reação do DEDNPP ($7,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) com 1MEI ($0,3 \text{ mol L}^{-1}$).	172
Figura A.10. Mapa de correlação a longa distância ^1H - ^{13}C da reação do DEDNPP ($7,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) com 1MEI ($0,3 \text{ mol L}^{-1}$).	172
Figura A.11. Expansão do mapa de correlação a longa distância ^1H - ^{13}C enfatizando as correlações dos núcleos de hidrogênio aromáticos na reação do DEDNPP ($7,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) com 1MEI ($0,3 \text{ mol L}^{-1}$).	173

- Figura A.12.** Expansão do mapa de correlação a longa distância ^1H - ^{13}C enfatizando as correlações dos núcleos de hidrogênio alifáticos na reação do DEDNPP ($7,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) com 1MEI ($0,3 \text{ mol L}^{-1}$)..... 173
- Figura A.13.** Mapa de correlação a longa distância ^1H - ^{31}P da reação do DEDNPP ($7,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) com 1MEI ($0,3 \text{ mol L}^{-1}$)..... 174
- Figura A.14.** Mapa de correlação a longa distância ^1H - ^{31}P enfatizando as correlações dos hidrogênios aromáticos na reação do DEDNPP ($7,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) com 1MEI ($0,3 \text{ mol L}^{-1}$)..... 174
- Figura A.15.** Mapa de correlação a longa distância ^1H - ^{31}P enfatizando as correlações dos grupos etila na reação do DEDNPP ($7,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) com 1MEI ($0,3 \text{ mol L}^{-1}$)..... 175
- Figura A.16.** Mapa de correlação a longa distância ^1H - ^{31}P da reação do DEDNPP ($7,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) com 2MEI ($0,3 \text{ mol L}^{-1}$)..... 175
- Figura A.17.** Mapa de correlação a longa distância ^1H - ^{13}C da reação do DEDNPP ($7,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) com 2MEI ($0,3 \text{ mol L}^{-1}$)..... 176
- Figura A.18.** Mapa de correlação direta ^1H - ^{13}C da reação do DEDNPP ($7,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) com 2MEI ($0,3 \text{ mol L}^{-1}$)..... 176
- Figura A.19.** Expansão do mapa de correlação direta ^1H - ^{13}C enfatizando as correlações dos núcleos de hidrogênio aromáticos na reação do DEDNPP ($7,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) com 2MEI ($0,3 \text{ mol L}^{-1}$)..... 177
- Figura A.20.** Expansão do mapa de correlação direta ^1H - ^{13}C enfatizando as correlações dos núcleos de hidrogênio aromáticos na reação do DEDNPP ($7,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) com 2MEI ($0,3 \text{ mol L}^{-1}$)..... 177
- Figura A.21.** Mapa de correlação a longa distância ^1H - ^{31}P da reação do DEDNPP ($7,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) com 4(5)MEI ($0,04 \text{ mol L}^{-1}$)..... 178
- Figura A.22.** Mapa de correlação a longa distância ^1H - ^{13}C da reação do DEDNPP ($7,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) com 4(5)MEI ($0,04 \text{ mol L}^{-1}$)..... 178
- Figura A.23.** Mapa de correlação direta ^1H - ^{13}C da reação do DEDNPP ($7,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) com 4(5)MEI ($0,04 \text{ mol L}^{-1}$)..... 179
- Figura A.24.** Expansão do mapa de correlação direta ^1H - ^{13}C enfatizando as correlações dos núcleos de hidrogênio aromáticos na reação do DEDNPP ($7,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) com 4(5)MEI ($0,04 \text{ mol L}^{-1}$)..... 179
- Tabela A.5.** Dados de RMN (600 MHz, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ a pH 8,5 e $25 \text{ }^\circ\text{C}$) das espécies 2MEI, 4(5)MEI, DNP e DEDNPP..... 180
- Tabela A.6.** Dados de RMN (600 MHz, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ a pH 8,5 e $25 \text{ }^\circ\text{C}$) das espécies 4-MIPI, 5-MIPI, 2-MIPI e DEP..... 181
- Figura A.25.** Espectros de RMN de ^1H para a reação de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ DEDNPP com $0,11 \text{ mol L}^{-1}$ 4(5)HMZ, 25% de D_2O , pH 8,5 e $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 182
- Figura A.26.** Mapa de correlação a longa distância HMBC (^1H : 400 MHz; ^{31}P : 161.9 MHz) para a reação de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ DEDNPP com $0,11 \text{ mol L}^{-1}$ 4(5)HMZ, pH 8,5, $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 182

Figura A.27. Mapa de correlação a longa distância HMBC (^1H : 400 MHz; ^{13}C : 100 MHz) para a reação de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ DEDNPP com $0,11 \text{ mol L}^{-1}$ 4(5)HMZ, pH 8,5, 25 °C.	183
Figura A.28. Mapa de correlação direta HSQC (^1H : 400 MHz; ^{13}C : 100 MHz) para a reação de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ DEDNPP com $0,11 \text{ mol L}^{-1}$ 4(5)HMZ, pH 8,5, 25 °C.....	183
Tabela A.7. Dados de RMN (600 MHz, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ a pH 8,5 e 25 °C) das espécies 4(5)HMZ e do intermediário 4(5)HMZnPI.	184
Figura A.29. Espectro de massas no modo negativo adquirido durante a reação do MMZ a $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ com DEDNPP $7,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em pH 10,5 a 25 °C.....	185
Figura A.30. Espectro de massas no modo negativo adquirido durante a reação do 4(5)HMZ a $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ com DEDNPP $7,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em pH 8,5.	185
Figura A.31. ESI-MS/MS do sinal em m/z 183 Da (DNP) obtido da reação do 4(5)HMZ a $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ com DEDNPP $7,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em pH 8,5.	186
B. Dados teóricos	187
Figura A.32. Estruturas dos ET e intermediário CM da reação com MMZ aniônico com DEDNPP, referentes aos ataques do nitrogênio ao fósforo ($\text{N}^{\cdots}\text{P}$), enxofre ao fósforo ($\text{S}^{\cdots}\text{P}$), e enxofre ao carbono aromático ($\text{S}^{\cdots}\text{C}$, CM, $\text{C}^{\cdots}\text{O}$), de acordo com o Esquema A.1.....	188
Figura A.33. Estruturas dos ET referentes à reação do 4(5)HMZ com DEDNPP em mecanismo de duas etapas (A) e concertado (B).	189
B.1. Coordenadas cartesianas (xyz) da conformação mais estável do DEDNPP ...	189
B.2. Coordenadas cartesianas (xyz) do ET da reação do MMZ neutro via ataque do nitrogênio ao fósforo.....	190
B.3. Coordenadas cartesianas (xyz) do ET da reação do MMZ neutro via ataque do enxofre ao fósforo	191
B.4. Coordenadas cartesianas (xyz) do ET ₁ da reação do MMZ neutro via ataque do enxofre ao carbono aromático.....	192
B.5. Coordenadas cartesianas (xyz) do intermediário CM da reação do MMZ neutro via ataque do enxofre ao carbono aromático	192
B.6. Coordenadas cartesianas (xyz) do ET ₂ da reação do MMZ neutro via ataque do enxofre ao carbono aromático.....	193
B.7. Coordenadas cartesianas (xyz) do ET da reação do MMZ aniônico via ataque do nitrogênio ao fósforo.....	194
B.8. Coordenadas cartesianas (xyz) do ET da reação do MMZ aniônico via ataque do enxofre ao fósforo	195
B.9. Coordenadas cartesianas (xyz) do ET ₁ da reação do MMZ aniônico via ataque do enxofre ao carbono aromático.....	196
B.10. Coordenadas cartesianas (xyz) do intermediário CM da reação do MMZ aniônico via ataque do enxofre ao carbono aromático	197
B.11. Coordenadas cartesianas (xyz) do ET ₂ da reação do MMZ aniônico via ataque do enxofre ao carbono aromático.....	198
B.12. Coordenadas cartesianas (xyz) do ET da reação do IMZ com DEDNPP	198

- B.13.** Coordenadas cartesianas (xyz) do ET da reação do 1MEI com DEDNPP 199
- B.14.** Coordenadas cartesianas (xyz) do ET da reação do 2MEI com DEDNPP 200
- B.15.** Coordenadas cartesianas (xyz) do ET da reação do 4MEI com DEDNPP 201
- B.16.** Coordenadas cartesianas (xyz) do ET da reação do 5MEI com DEDNPP 202
- B.17.** Coordenadas cartesianas (xyz) do ET₁ da 4HMZ com DEDNPP via oxigênio, referente a etapa de transferência intramolecular do próton no 4(5)HMZ, mostrado na Figura 32A do apêndice. 203
- B.18.** Coordenadas cartesianas (xyz) do ET₂ da segunda etapa da reação do 4(5)HMZ pelo oxigênio aniônico com DEDNPP, mostrado na Figura 33A do apêndice..... 203
- B.19.** Coordenadas cartesianas (xyz) do ET da reação do 4(5)HMZ pelo oxigênio com DEDNPP em mecanismo concertado, mostrado na Figura 33B do apêndice. 204
- B.20.** Coordenadas cartesianas (xyz) do ET da reação do 5HMZ com DEDNPP... 205
- B.21.** Coordenadas cartesianas (xyz) do ET da reação do 4HMZ com DEDNPP... 205
- B.22.** Coordenadas cartesianas (xyz) do ET da reação do 5MOMI com DEDNPP. 206
- B.23.** Coordenadas cartesianas (xyz) do ET da reação do 4MOMI com DEDNPP. 207
- B.24.** Coordenadas cartesianas (xyz) do ET da reação do 5FZ com DEDNPP 208
- B.25.** Coordenadas cartesianas (xyz) do ET da reação do 5CIZ com DEDNPP..... 209
- B.26.** Coordenadas cartesianas (xyz) do ET da reação do 5BrZ com DEDNPP 210
- B.27.** Coordenadas cartesianas (xyz) do ET da reação do 5IZ com DEDNPP ^a 210
- B.28.** Coordenadas cartesianas (xyz) do ET da reação do 5IPZ com DEDNPP..... 211
- B.29.** Coordenadas cartesianas (xyz) do ET da reação do 5AZ com DEDNPP 212
- B.30.** Coordenadas cartesianas (xyz) do ET da reação do 5HZ com DEDNPP 213
- B.31.** Coordenadas cartesianas (xyz) do ET da reação do 2AZ com DEDNPP 214
- B.32.** Coordenadas cartesianas (xyz) do ET₁ da reação do 2HZ com DEDNPP 214
- B.33.** Coordenadas cartesianas (xyz) do intermediário pentacoordenado da reação do 2HZ com DEDNPP 215
- B.34.** Coordenadas cartesianas (xyz) do ET₂ da reação do 2HZ com DEDNPP 216

A seguir estão apresentadas as tabelas e gráficos de dados experimentais, espectros e coordenadas cartesianas das estruturas obtidas pelos cálculos teóricos.

A. Dados experimentais

Tabela A.1. Dados de perfil de pH (k_1 vs pH) para reação do MMZ a $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ com DEDNPP a 25°C .

MMZ+DEDNPP				Dimerização do MMZ (solução apenas com o nucleófilo)	
pH	$k_1 \text{ (s}^{-1}\text{)}$	pH	$k_1 \text{ (s}^{-1}\text{)}$	pH	$k_D \text{ (s}^{-1}\text{)}$
7,08	$5,27 \times 10^{-5}$	9,93	0,0082	7,5	$1,93 \times 10^{-6}$
7,3	$5,44 \times 10^{-5}$	10,2	0,01292	8,5	$3,17 \times 10^{-5}$
7,9	$1,51 \times 10^{-4}$	10,47	0,0274	9,5	$8,57 \times 10^{-5}$
8,2	$1,90 \times 10^{-4}$	11,11	0,0849	10	$1,00 \times 10^{-4}$
8,5	$6,50 \times 10^{-4}$	11,47	0,168	10,5	$1,89 \times 10^{-4}$
8,92	$8,82 \times 10^{-4}$	11,68	0,2104	10,7	$2,19 \times 10^{-4}$
9,2	0,00169	11,96	0,267	11	$3,44 \times 10^{-4}$
9,39	0,0032	12,25	0,341	11,22	$5,60 \times 10^{-4}$
9,6	0,00369			11,52	$8,31 \times 10^{-4}$

Tabela A.2. Dados de perfil de pH (k_{obs} versus pH) para reação do 1MEI, 2MEI e 4(5)MEI a $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ com DEDNPP a 25°C .

1MEI		2MEI		4(5)MEI	
pH	$k_{obs} \text{ (s}^{-1}\text{)}$	pH	$k_{obs} \text{ (s}^{-1}\text{)}$	pH	$k_{obs} \text{ (s}^{-1}\text{)}$
5,5	$2,65 \times 10^{-4}$	6,49	$1,21 \times 10^{-4}$	5,5	$2,45 \times 10^{-4}$
6	$6,56 \times 10^{-4}$	7,02	$3,22 \times 10^{-4}$	6	$6,77 \times 10^{-4}$
6,5	0,00149	7,51	$6,46 \times 10^{-4}$	6,5	0,00169
7	0,003	7,91	0,00104	7	0,00357
7,3	0,00426	8,51	0,00167	7,5	0,0069
7,5	0,00482	9,04	0,00201	8	0,01
8	0,00566	9,46	0,00216	8,5	0,0124
8,5	0,00605	10,03	0,00231	9	0,01346
9	0,0061			9,5	0,01369
10	0,00631			10	0,01379

Tabela A.3. Dados cinéticos (k_{obs}) da reação de solvólise do DEDNPP e das reações do IMZ e 1MEI com DEDNPP em cada fração molar da mistura DMSO/H₂O a 25°C.

Solvólise do DEDNPP		IMZ+DEDNPP		1MEI+DEDNPP	
Fração molar (DMSO)	k_{obs} (s ⁻¹)	Fração Molar (DMSO)	k_{obs} (s ⁻¹)	Fração Molar (DMSO)	k_{obs} (s ⁻¹)
0	3,59956X10 ⁻⁵	0	0,01402	0	0,0097
0,1	3,33043X10 ⁻⁵	0,1	0,01026	0,1	0,00704
0,2	3,18735X10 ⁻⁵	0,2	0,0101	0,2	0,00706
0,3	3,10377X10 ⁻⁵	0,3	0,0134	0,3	0,00856
0,4	2,17465X10 ⁻⁵	0,4	0,01864	0,4	0,01132
0,5	2,35841X10 ⁻⁵	0,5	0,01402	0,5	0,0097
0,6	2,22137X10 ⁻⁵	0,6	0,02262	0,6	0,01226
0,7	1,98477X10 ⁻⁵	0,7	0,02596	0,7	0,0137
0,8	2,01303X10 ⁻⁵	0,8	0,03324	0,8	0,01434
0,9	1,91329X10 ⁻⁵	0,9	0,03738	0,9	0,01766
1	1,98889X10 ⁻⁵	1	0,04136	1	0,01818

Tabela A.4. Dados de perfil de pH (k_{obs} versus pH) para reação do 4(5)HMZ a 0,2 mol L⁻¹ com DEDNPP a 25°C.

pH	k_{obs} (s ⁻¹)	pH	k_{obs} (s ⁻¹)
5,5	9,95X10 ⁻⁵	8	7,68 X10 ⁻⁴
6	2,33 X10 ⁻⁴	8,5	8,28 X10 ⁻⁴
6,3	3,58 X10 ⁻⁴	9	8,05 X10 ⁻⁴
6,8	5,16 X10 ⁻⁴	9,5	8,12 X10 ⁻⁴
7	6,39 X10 ⁻⁴	10	8,21 X10 ⁻⁴
7,5	6,66 X10 ⁻⁴	10,5	8,35 X10 ⁻⁴

Figura A.1. A. Plot de Eyring da reação do DEDNPP ($3,75 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) com MMZ ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$). B. Perfil de concentração da reação do DEDNPP ($3,75 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) com MMZ.

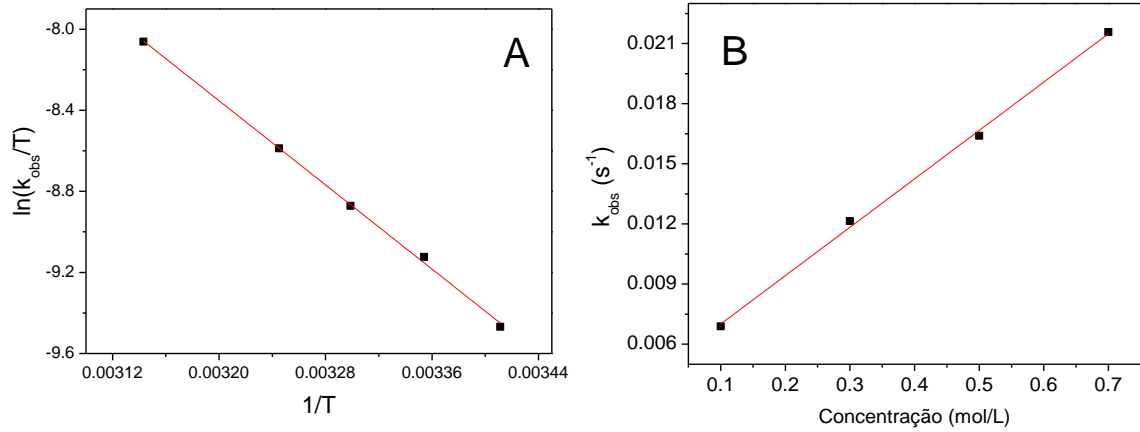


Figura A.2. Plots de Eyring das reações do 4(5)HMZ ($0,2 \text{ mol L}^{-1}$) e xMEI ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$) com DEDNPP ($3,75 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$).

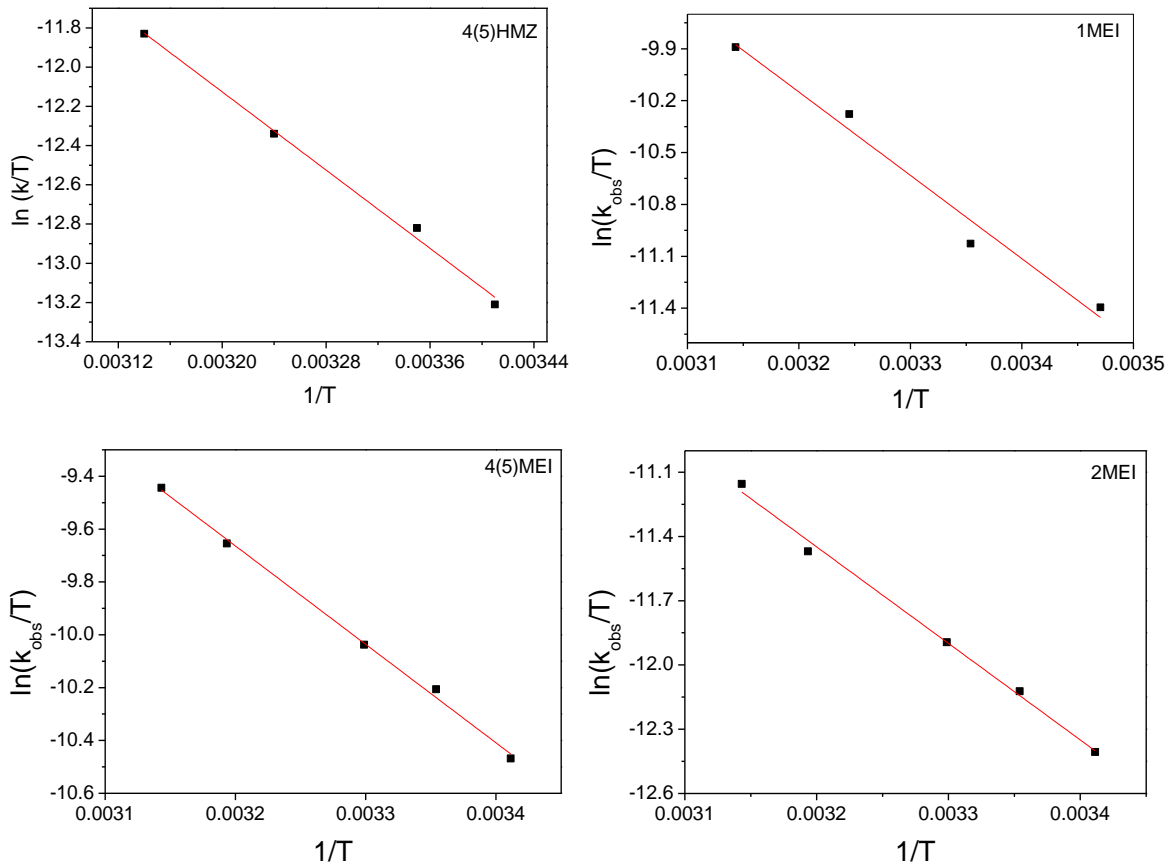


Figura A.3. Expansão dos espectros de RMN de ^1H (600 MHz) do DEDNPP ($1,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) e 1MEI ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) puros, mostrando a faixa de 9,0 a 6,6 ppm, em pH 8,5 e 25 °C.

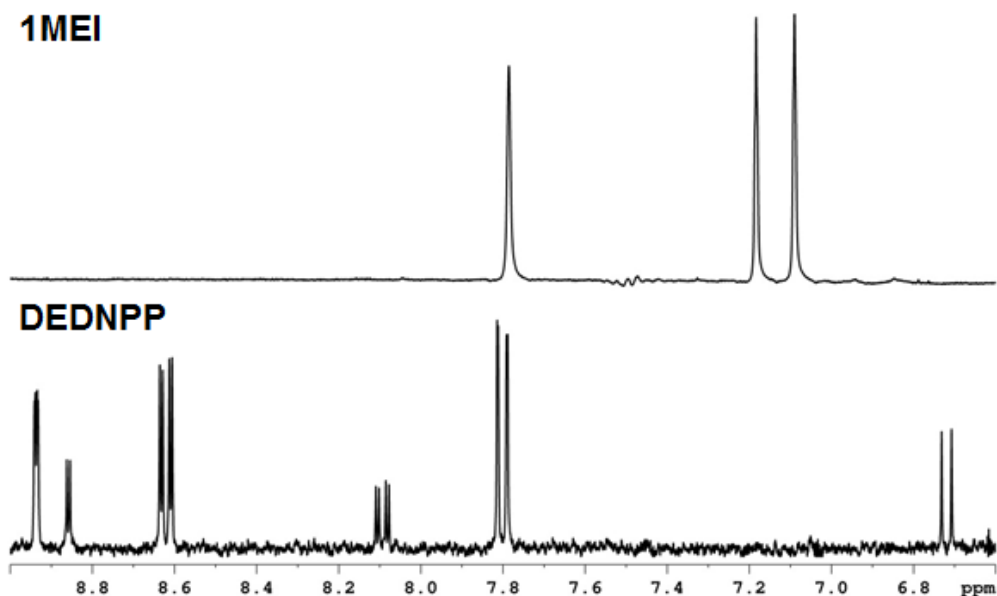


Figura A.4. Expansão dos espectros de RMN de ^1H (600 MHz) do DEDNPP ($1,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) e 1MEI ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) puros, mostrando a faixa de 4,5 a 1,2 ppm, em pH 8,5 e 25 °C.

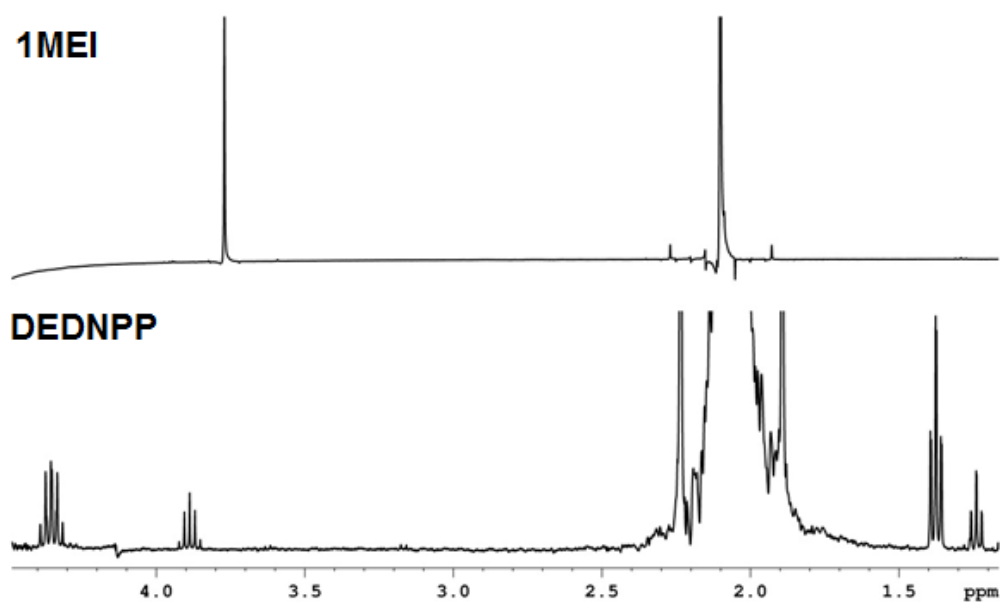


Figura A.5. Espectros de RMN de ^1H para a reação do DEDNPP ($7,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) com 2MEI ($0,3 \text{ mol L}^{-1}$), 25% de D_2O , pH 8,5 e 25°C .

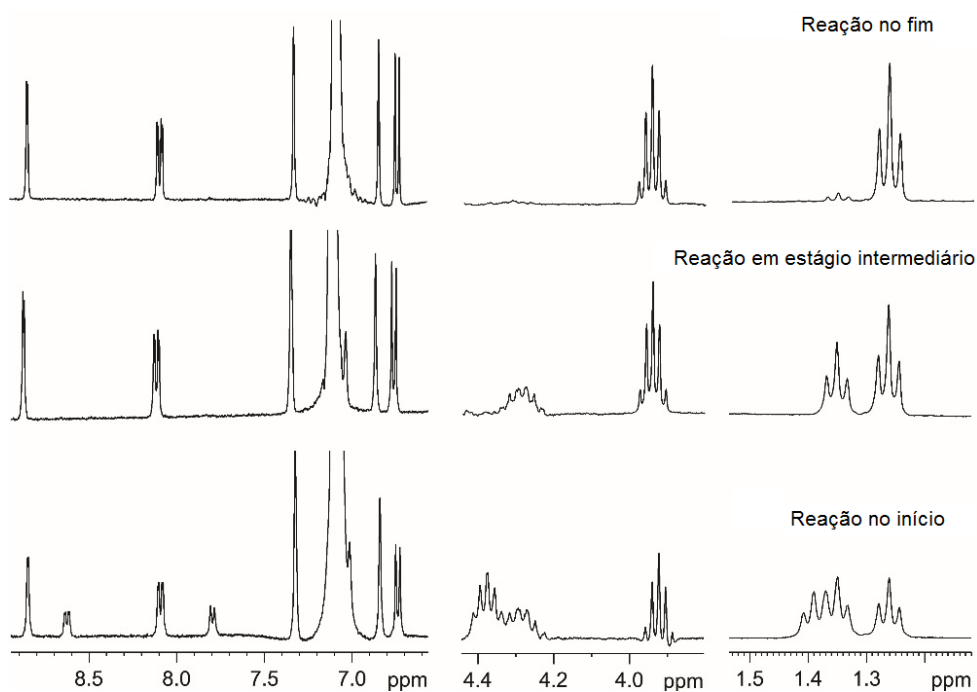


Figura A.6. Espectros de RMN de ^1H para a reação do DEDNPP ($7,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) com 4(5)MEI ($0,04 \text{ mol L}^{-1}$), 25% de D_2O , pH 8,5 e 25°C .

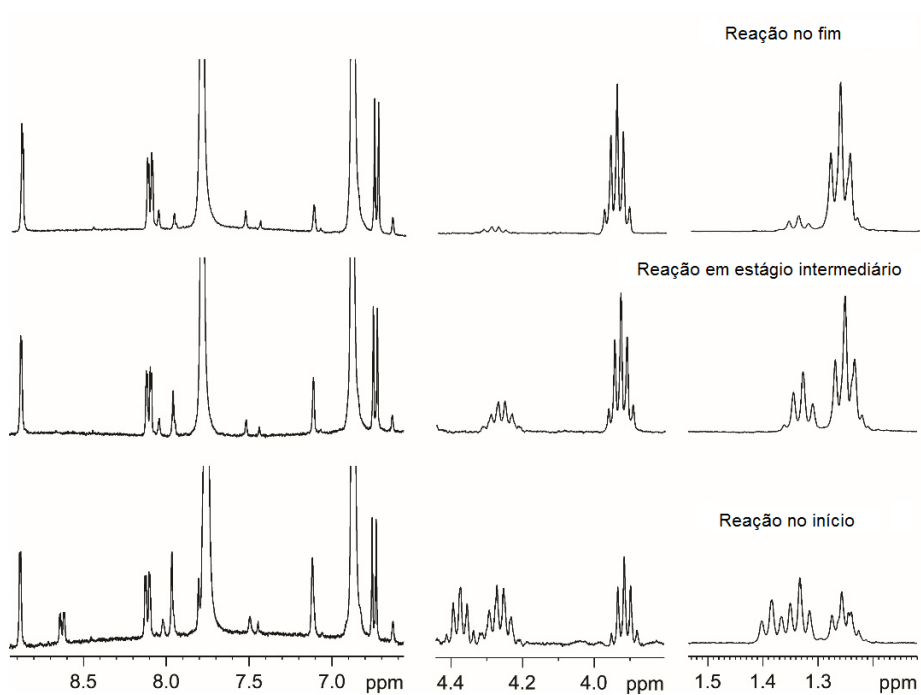


Figura A.7. Mapa de correlação direta ^1H - ^{13}C da reação do DEDNPP ($7,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) com 1MEI ($0,3 \text{ mol L}^{-1}$).

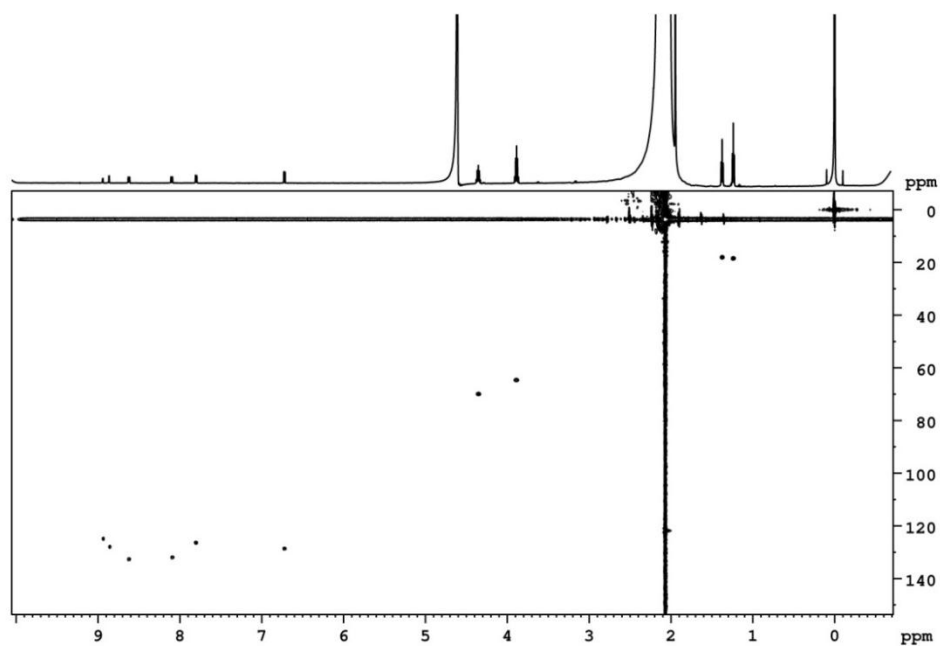


Figura A.8. Expansão do mapa de correlação direta ^1H - ^{13}C enfatizando as correlações dos núcleos de hidrogênio aromáticos na reação do DEDNPP ($7,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) com 1MEI ($0,3 \text{ mol L}^{-1}$).

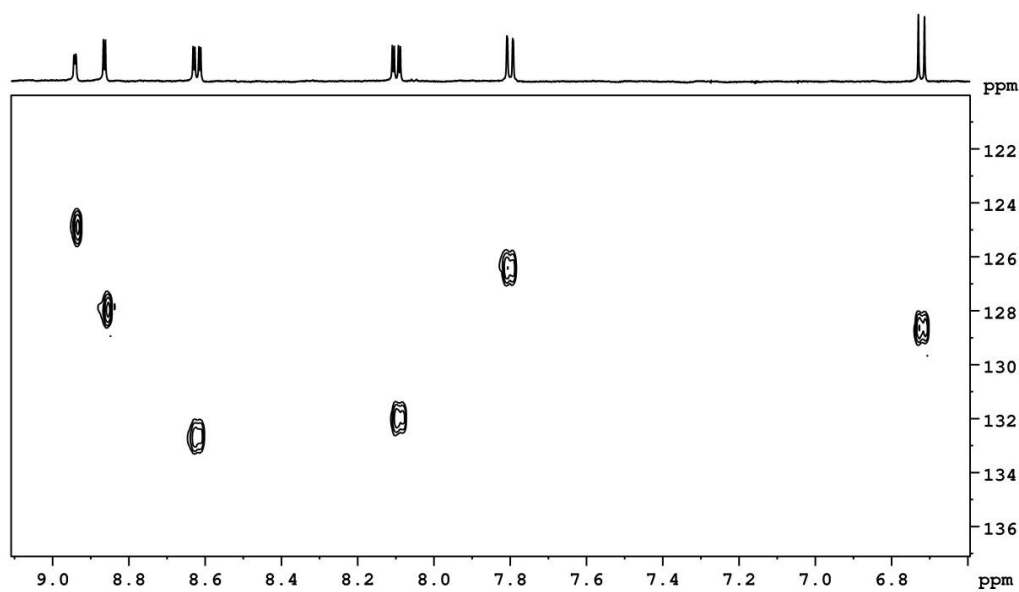


Figura A.9. Expansão do mapa de correlação direta ^1H - ^{13}C enfatizando as correlações dos grupos etila na reação do DEDNPP ($7,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) com 1MEI ($0,3 \text{ mol L}^{-1}$).

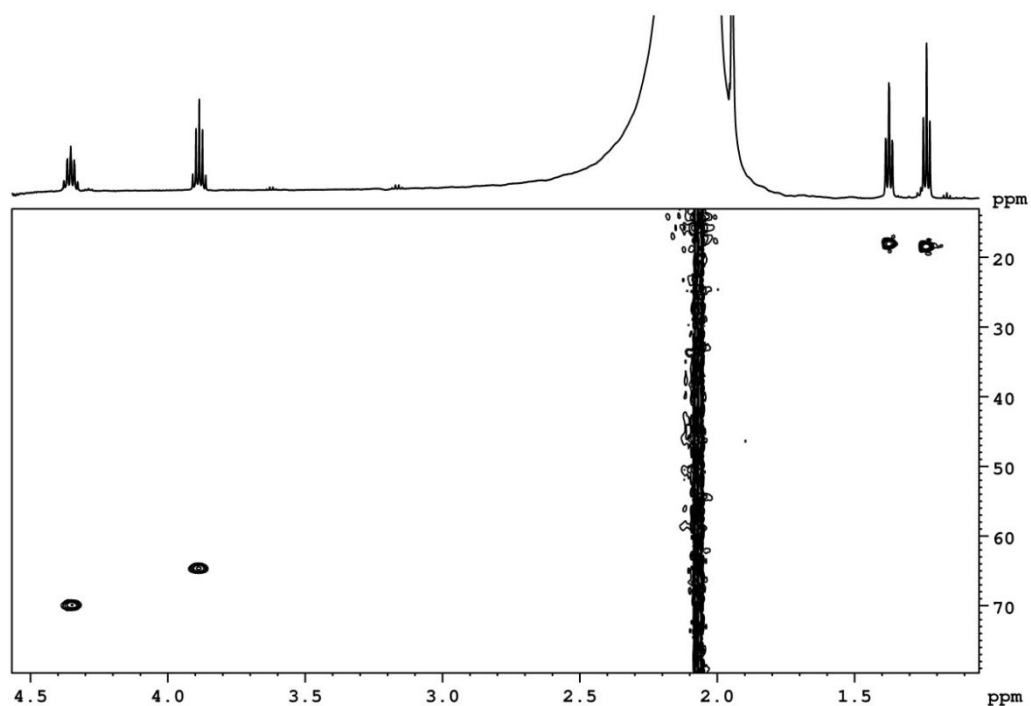


Figura A.10. Mapa de correlação a longa distância ^1H - ^{13}C da reação do DEDNPP ($7,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) com 1MEI ($0,3 \text{ mol L}^{-1}$).

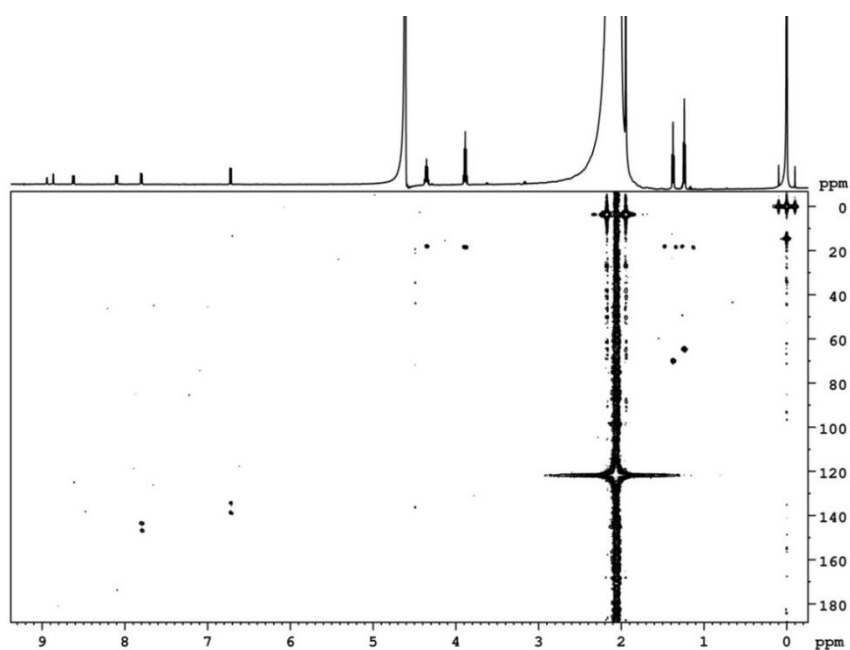


Figura A.11. Expansão do mapa de correlação a longa distância ^1H - ^{13}C enfatizando as correlações dos núcleos de hidrogênio aromáticos na reação do DEDNPP ($7,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) com 1MEI ($0,3 \text{ mol L}^{-1}$).

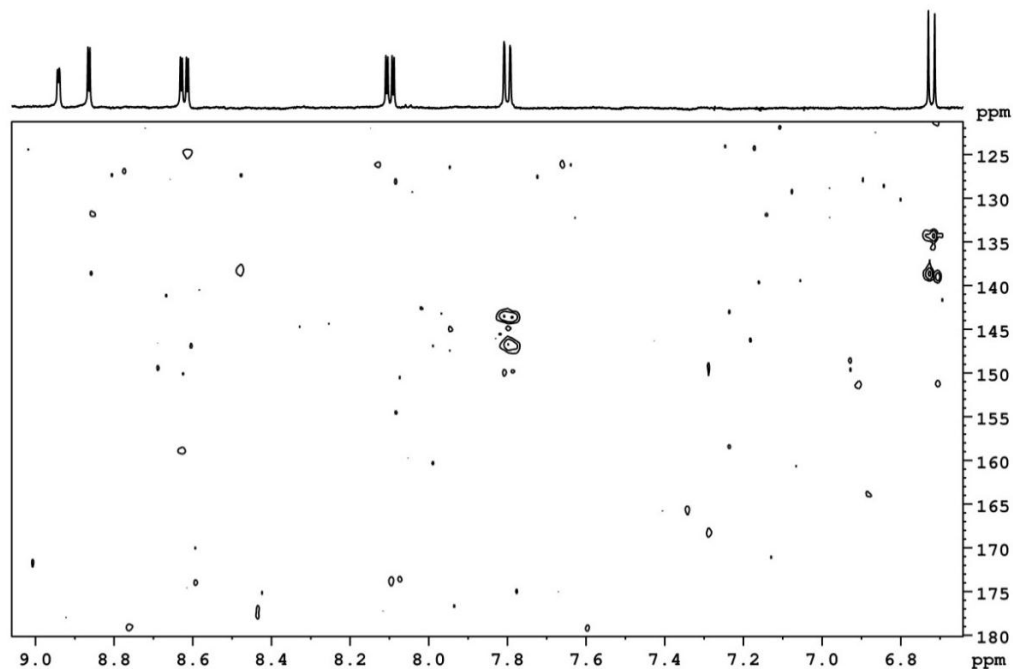


Figura A.12. Expansão do mapa de correlação a longa distância ^1H - ^{13}C enfatizando as correlações dos núcleos de hidrogênio alifáticos na reação do DEDNPP ($7,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) com 1MEI ($0,3 \text{ mol L}^{-1}$).

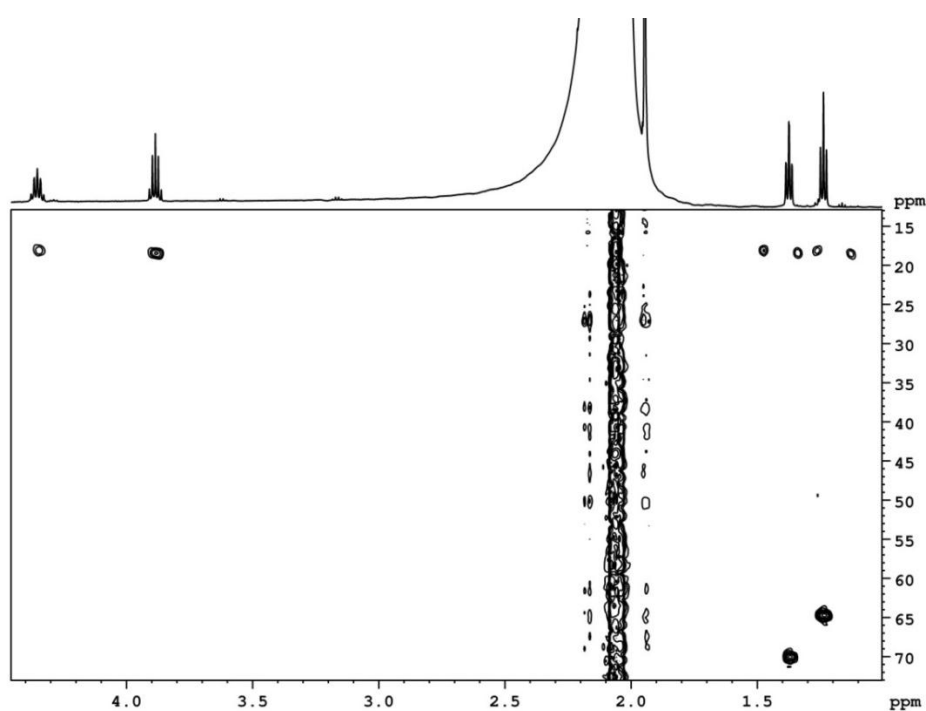


Figura A.13. Mapa de correlação a longa distância ^1H - ^{31}P da reação do DEDNPP ($7,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) com 1MEI ($0,3 \text{ mol L}^{-1}$).

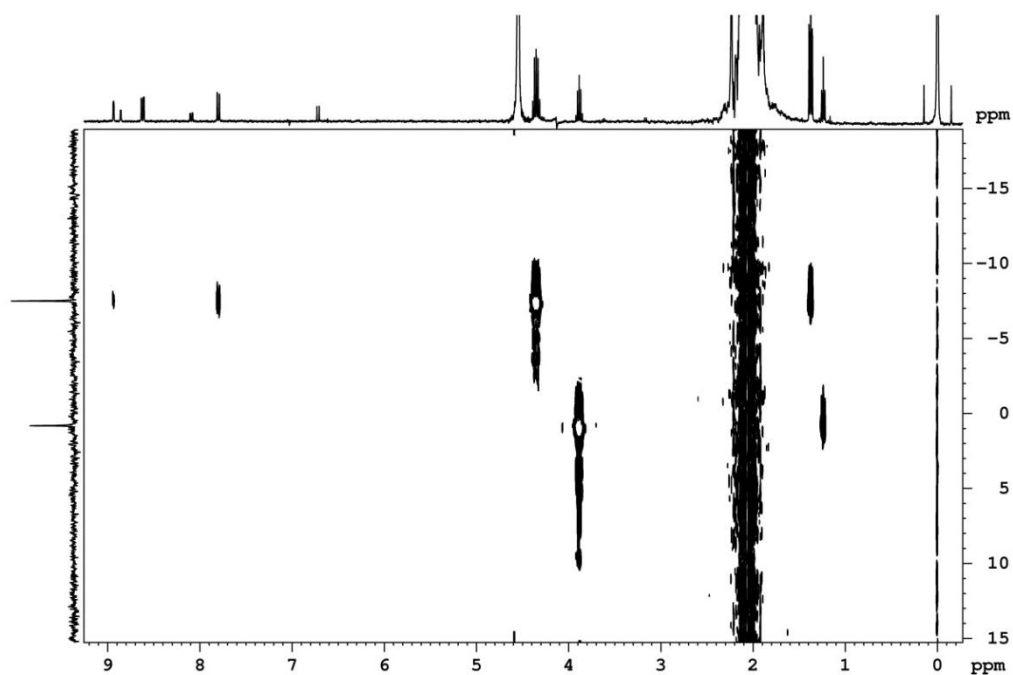


Figura A.14. Mapa de correlação a longa distância ^1H - ^{31}P enfatizando as correlações dos hidrogênios aromáticos na reação do DEDNPP ($7,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) com 1MEI ($0,3 \text{ mol L}^{-1}$).

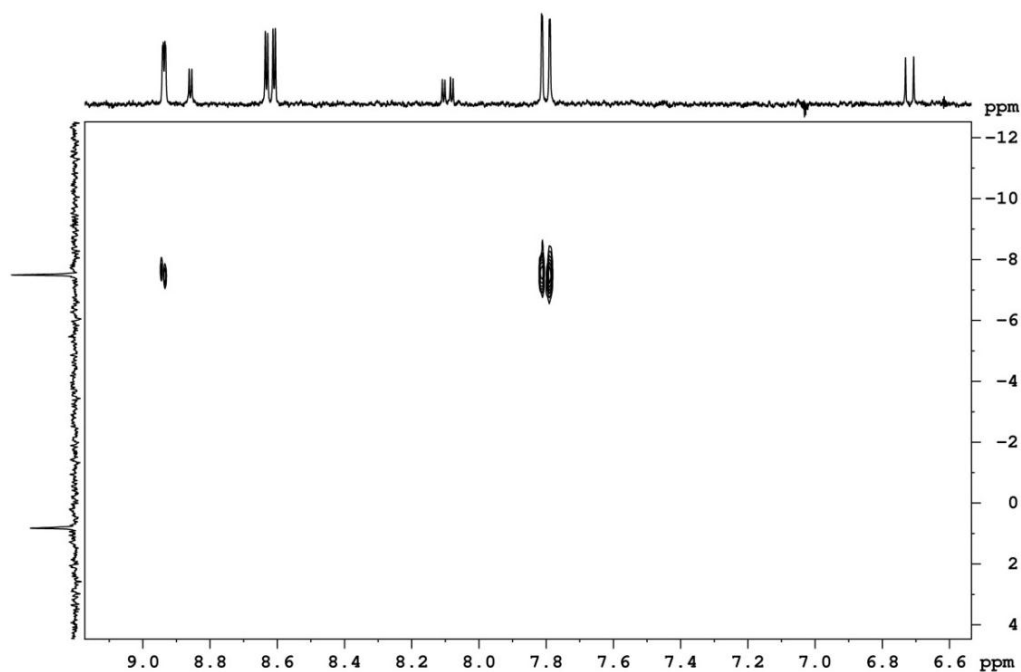


Figura A.15. Mapa de correlação a longa distância ^1H - ^{31}P enfatizando as correlações dos grupos etila na reação do DEDNPP ($7,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) com 1MEI ($0,3 \text{ mol L}^{-1}$).

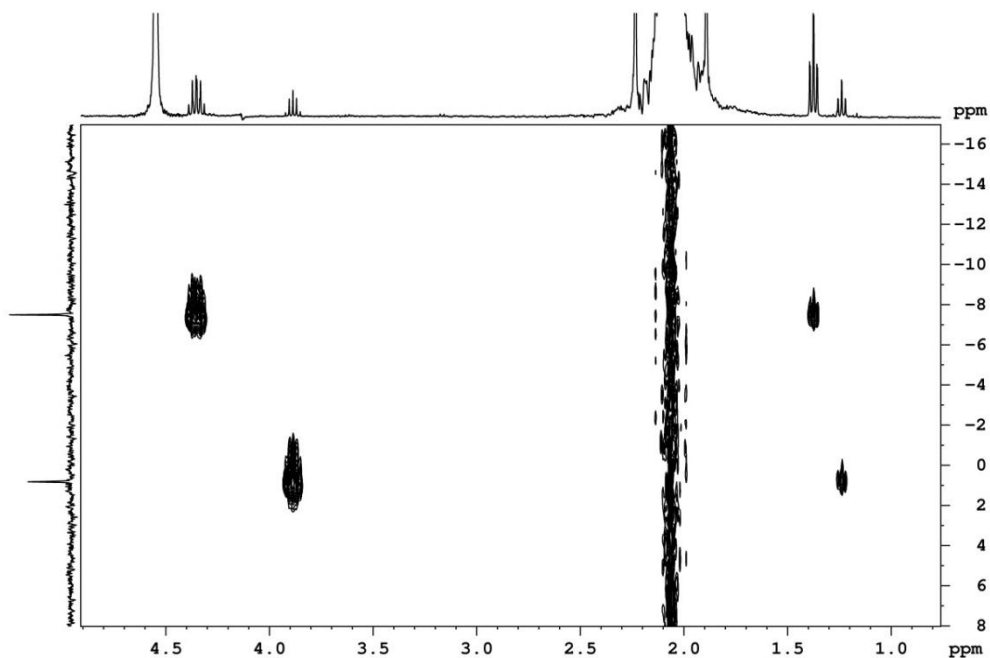


Figura A.16. Mapa de correlação a longa distância ^1H - ^{31}P da reação do DEDNPP ($7,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) com 2MEI ($0,3 \text{ mol L}^{-1}$).

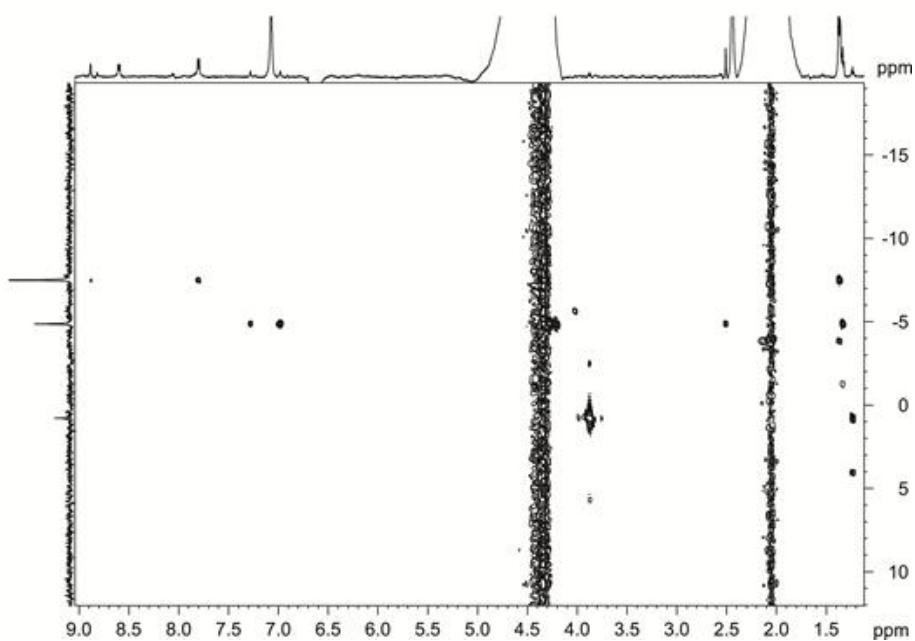


Figura A.17. Mapa de correlação a longa distância ^1H - ^{13}C da reação do DEDNPP ($7,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) com 2MEI ($0,3 \text{ mol L}^{-1}$).

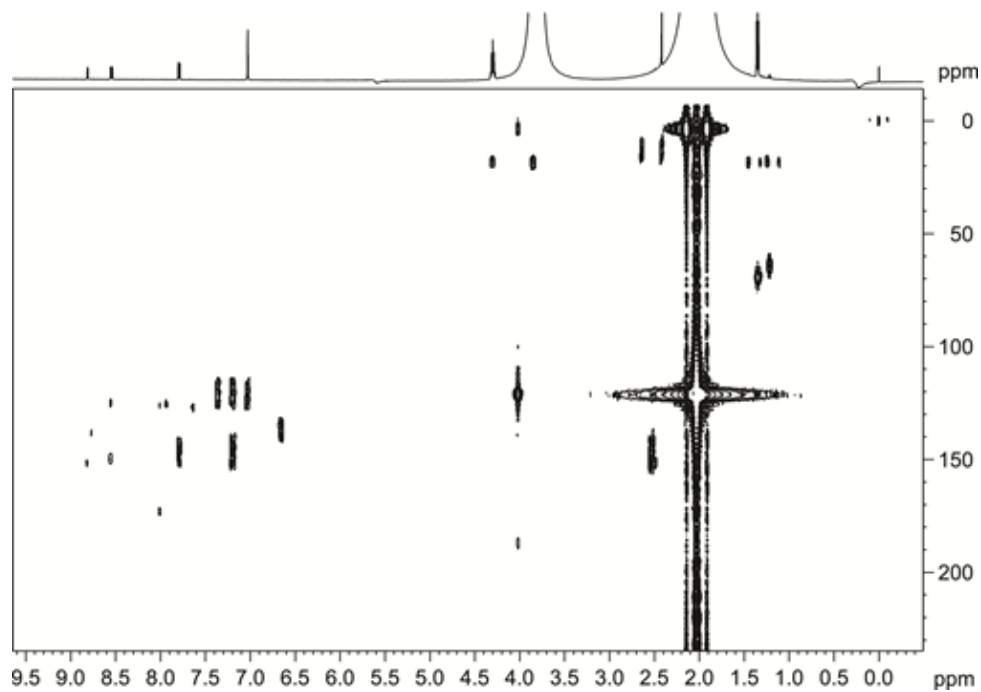


Figura A.18. Mapa de correlação direta ^1H - ^{13}C da reação do DEDNPP ($7,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) com 2MEI ($0,3 \text{ mol L}^{-1}$).

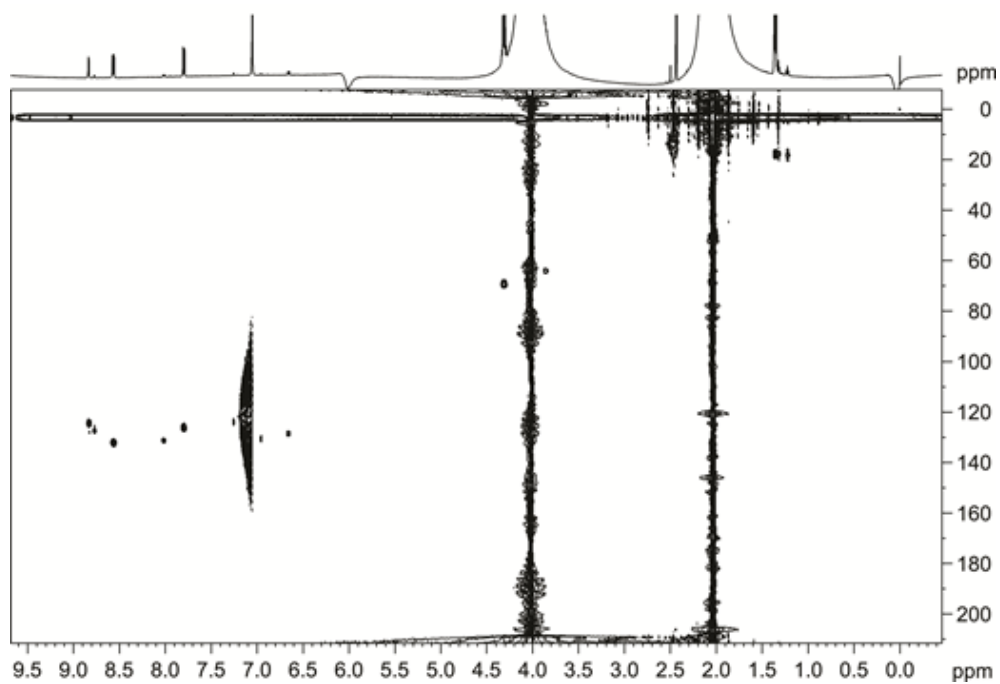


Figura A.19. Expansão do mapa de correlação direta ^1H - ^{13}C enfatizando as correlações dos núcleos de hidrogênio aromáticos na reação do DEDNPP ($7,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) com 2MEI ($0,3 \text{ mol L}^{-1}$).

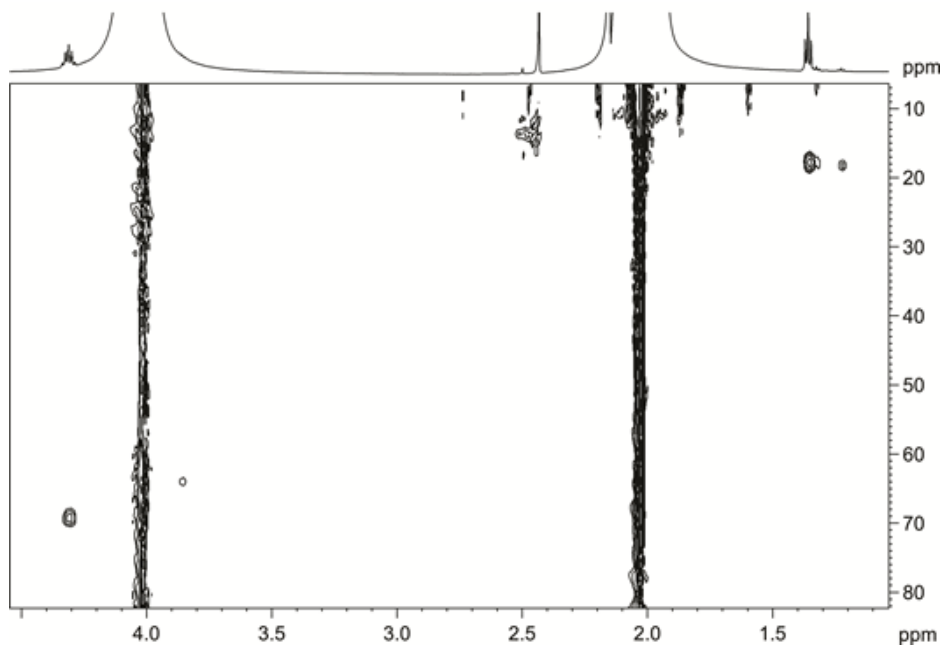


Figura A.20. Expansão do mapa de correlação direta ^1H - ^{13}C enfatizando as correlações dos núcleos de hidrogênio aromáticos na reação do DEDNPP ($7,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) com 2MEI ($0,3 \text{ mol L}^{-1}$).

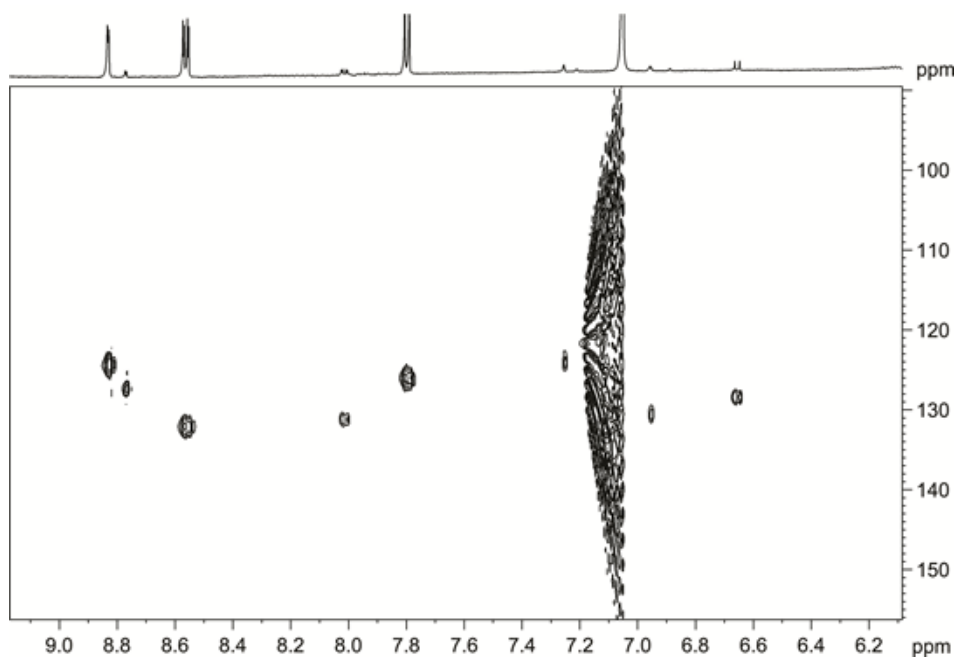


Figura A.21. Mapa de correlação a longa distância ^1H - ^{31}P da reação do DEDNPP ($7,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) com 4(5)MEI ($0,04 \text{ mol L}^{-1}$).

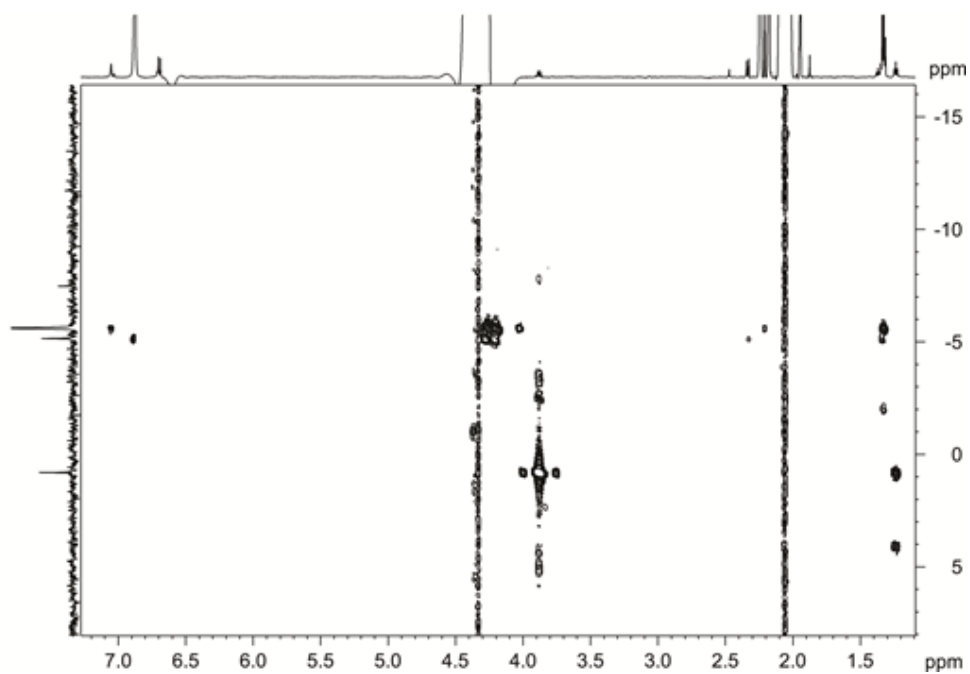


Figura A.22. Mapa de correlação a longa distância ^1H - ^{13}C da reação do DEDNPP ($7,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) com 4(5)MEI ($0,04 \text{ mol L}^{-1}$).

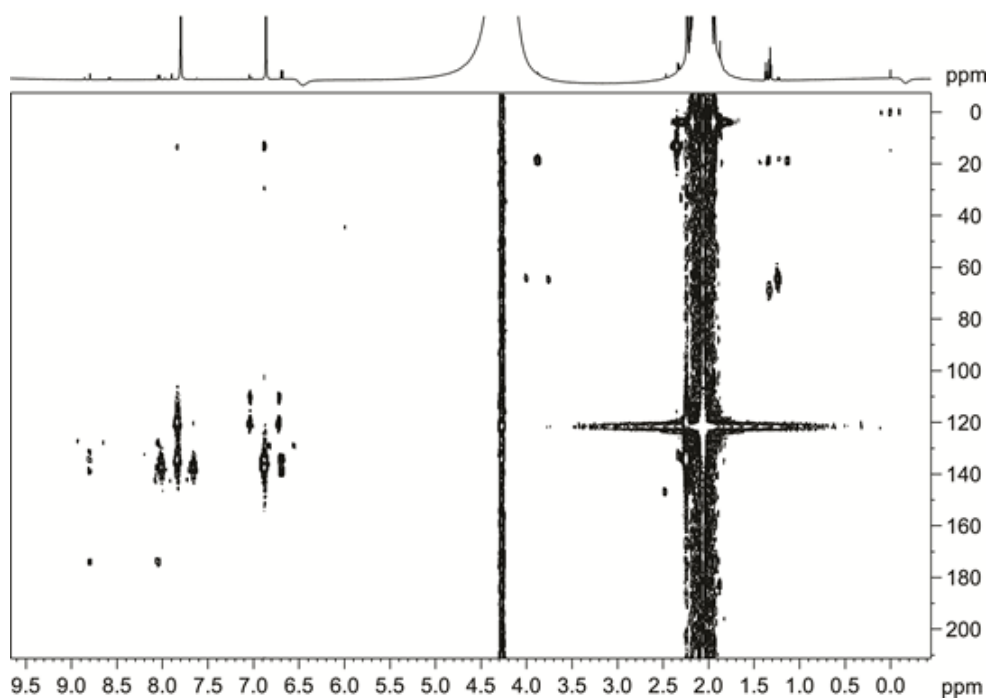


Figura A.23. Mapa de correlação direta ^1H - ^{13}C da reação do DEDNPP ($7,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) com 4(5)MEI ($0,04 \text{ mol L}^{-1}$).

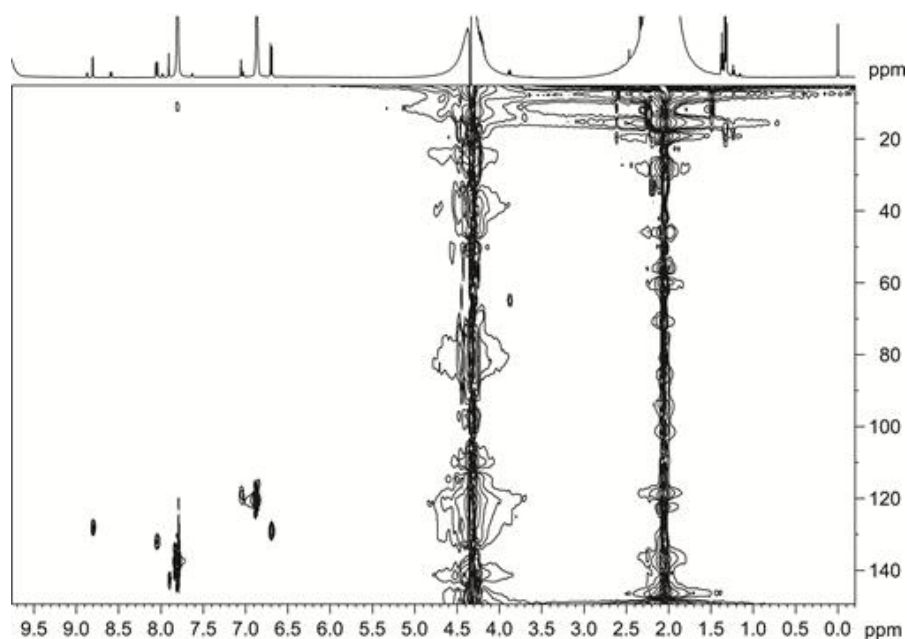


Figura A.24. Expansão do mapa de correlação direta ^1H - ^{13}C enfatizando as correlações dos núcleos de hidrogênio aromáticos na reação do DEDNPP ($7,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) com 4(5)MEI ($0,04 \text{ mol L}^{-1}$).

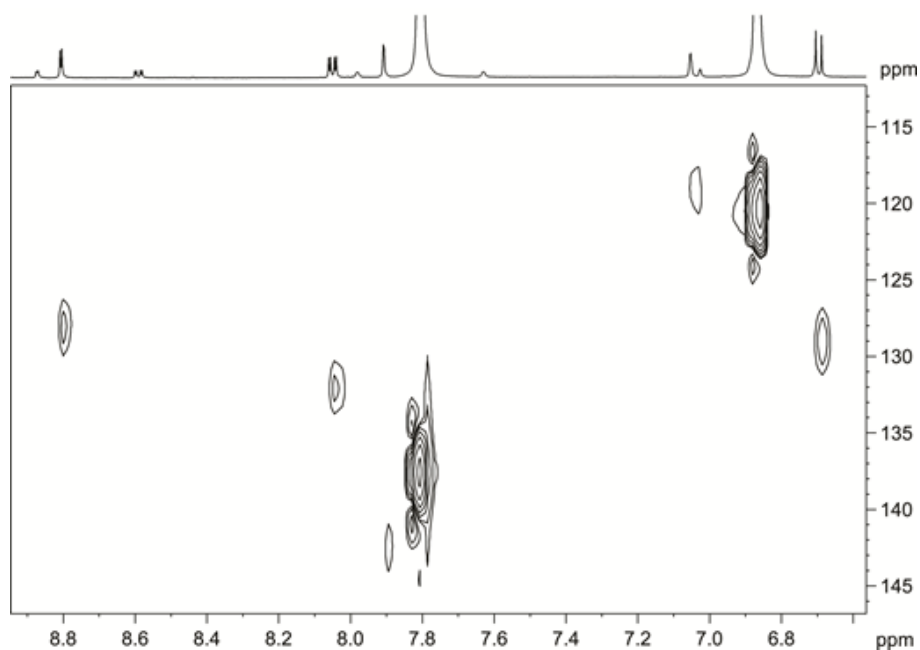
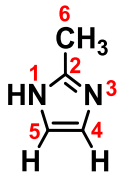
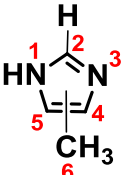
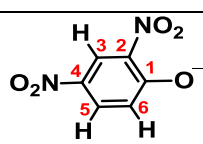
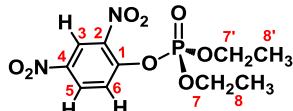
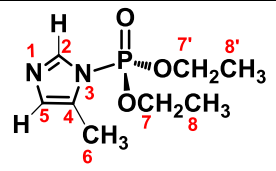
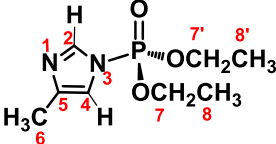
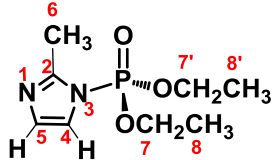
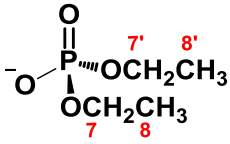


Tabela A.5. Dados de RMN (600 MHz, H₂O/D₂O a pH 8,5 e 25 °C) das espécies 2MEI, 4(5)MEI, DNP e DEDNPP.

	1	2	3	4	5	6	7/7'	8/8'	
 <p>2MEI</p>	δ_{H}			7,09 s (1H)	7,09 s (1H)	2,45 s (3H)			
	δ_{C}	147,5		122	122	14,2			
 <p>4(5)MEI</p>	δ_{H}	7,08 s (1H)			6,87 q (1,1, 1H)	2,23 d (1,1, 3H)			
	δ_{C}	137		119,4	133,9	12,7			
 <p>DNP</p>	δ_{H}		8,85 dd (3,1, 0,7, 1H)		8,09 dd (9,7, 3,1, 1H)	6,74 dd (9,7, 0,7, 1H)			
	δ_{C}	173,4	135,7	127,6	139,1	131,4	128,4		
 <p>DEDNPP</p>	δ_{H}		8,99 dd (2,7, 0,9, 1H)		8,63 dd (9,2, 2,7, 1H)	7,80 dd (9,2, 0,9, 1H)	4.38 dq (8.6, 7,1, 4H)	1.39 td (7,1, 1,0, 6H)	
	δ_{C}	150,3	142,7	124,3	148,7	132,3	126	69,4	17,9
	δ_{P}					-7,5			

*Não foi atribuído devido a sobreposição de sinais.

Tabela A.6. Dados de RMN (600 MHz, H₂O/D₂O a pH 8,5 e 25 °C) das espécies 4-MIPI, 5-MIPI, 2-MIPI e DEP.

	1	2	3	4	5	6	7/7'	8/8'
 <p>4-MIPI</p>	δ_{H}	7,83 (sobreposto)			6,88 (sobreposto)	2,33 d (1,1, 3H)	4,25 dq (8,3, 7,2, 4H)	1,33 td (7,2, 0,7, 6H)
	δ_{C}	136,6		132,2	133,4	#	69,2	17,8
	δ_{P}				-5,2			
 <p>5-MIPI</p>	δ_{H}	7,91 s (1H)		7,05 q (1,3, 1H)		2,20 d (1,3, 3H)	4,22 dq (8,4, 7,1, 4H)	1,32 td (7,1, 0,8, 6H)
	δ_{C}	141,7		117,9	142,9	#	68,9	17,7
	δ_{P}				-5,6			
 <p>2-MIPI</p>	δ_{H}			7,32 d (1,7, 1H)	7,02 d (1,7, 1H)	2,53 s (3H)	4,27 dq (8,6, 7,1, 4H)	1,35 td (7,1, 1,0, 6H)
	δ_{C}	151,3		124,3	130,8	16,7	69,4	17,9
	δ_{P}				-4,9			
 <p>DEP</p>	δ_{H}						3,92 dq (7,8, 7,1, 4H)	1,25 td (7,1, 0,9, 6H)
	δ_{C}						64,1	18,3
	δ_{P}				0,8			

#Não foi atribuído devido a sobreposição de sinais.

Figura A.25. Espectros de RMN de ^1H para a reação de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ DEDNPP com $0,11 \text{ mol L}^{-1}$ 4(5)HMZ, 25% de D_2O , pH 8,5 e 25°C .

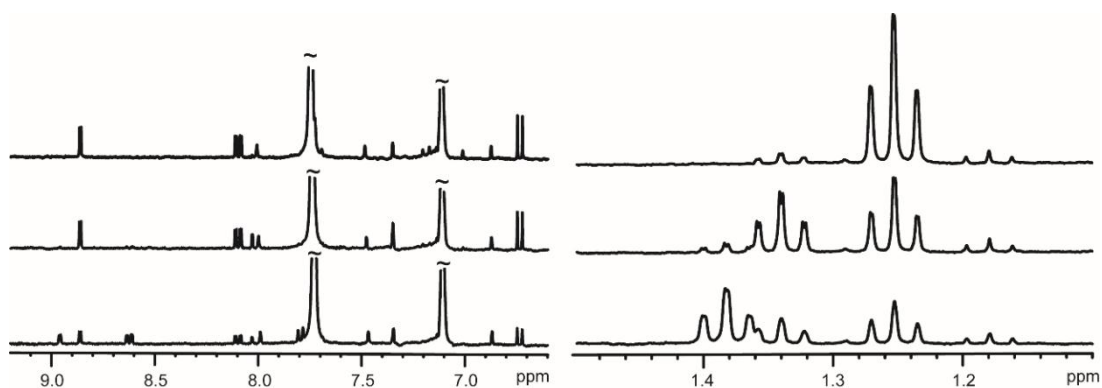


Figura A.26. Mapa de correlação a longa distância HMBC (^1H : 400 MHz; ^{31}P : 161,9 MHz) para a reação de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ DEDNPP com $0,11 \text{ mol L}^{-1}$ 4(5)HMZ, pH 8,5 e 25°C .

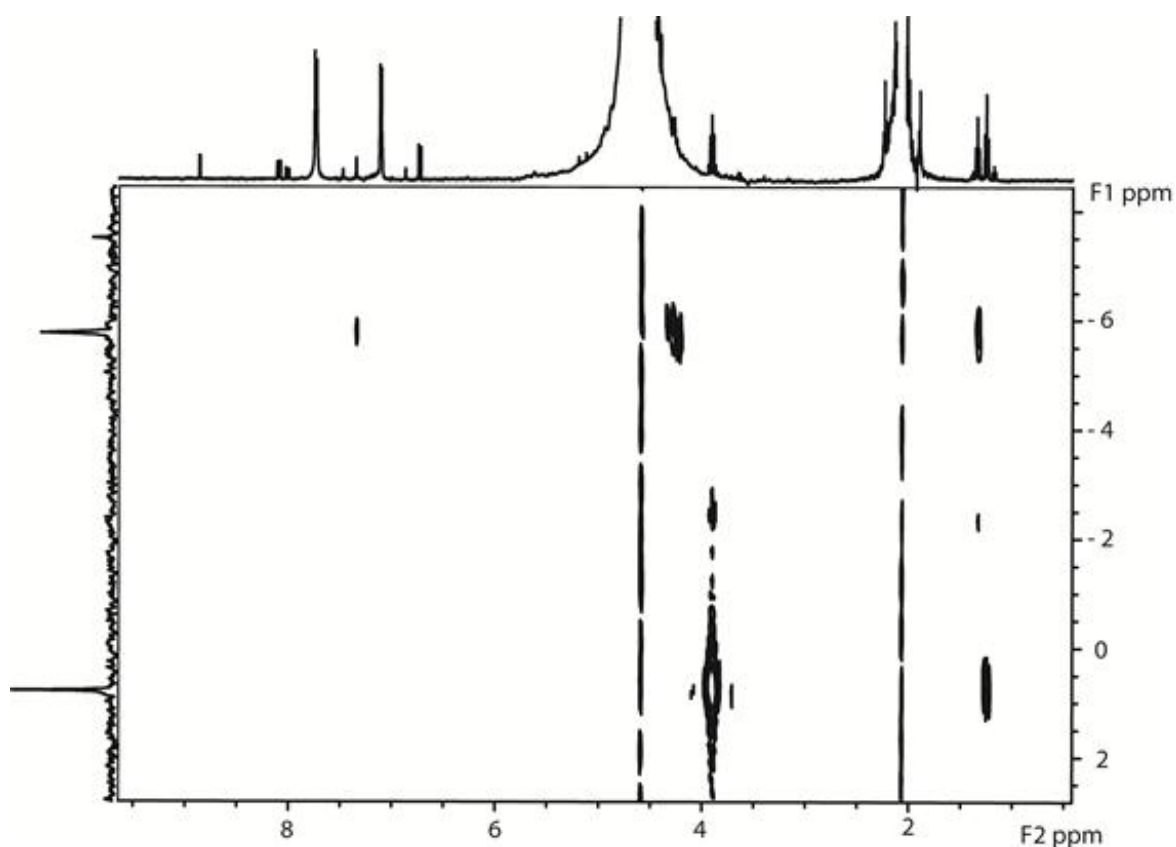


Figura A.27. Mapa de correlação a longa distância HMBC (^1H : 400 MHz; ^{13}C : 100 MHz) para a reação de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ DEDNPP com $0,11 \text{ mol L}^{-1}$ 4(5)HMZ, pH 8,5 e $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

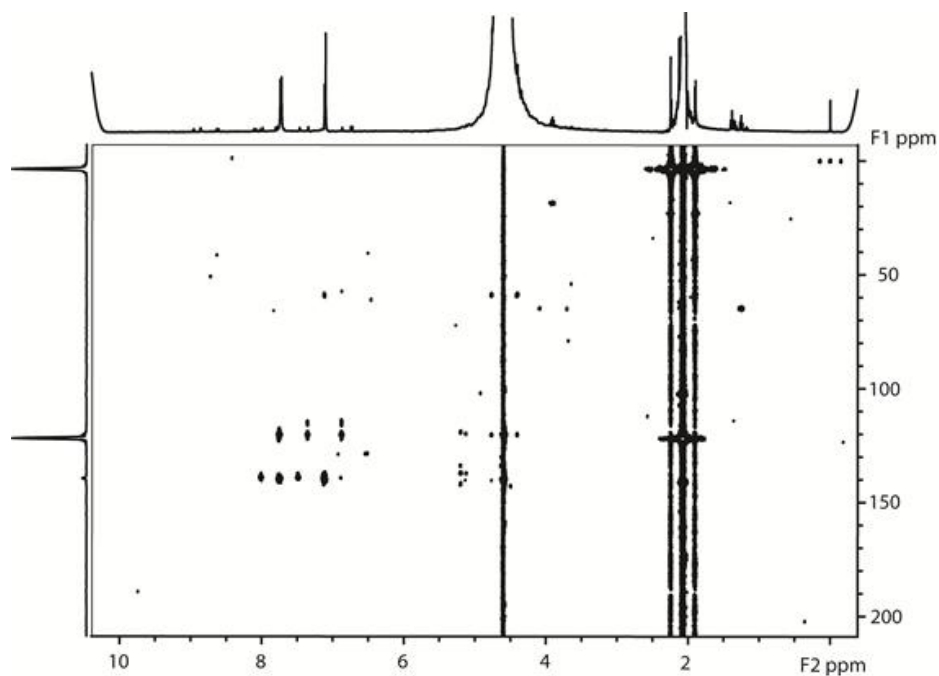


Figura A.28. Mapa de correlação direta HSQC (^1H : 400 MHz; ^{13}C : 100 MHz) para a reação de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ DEDNPP com $0,11 \text{ mol L}^{-1}$ 4(5)HMZ, pH 8,5 e $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

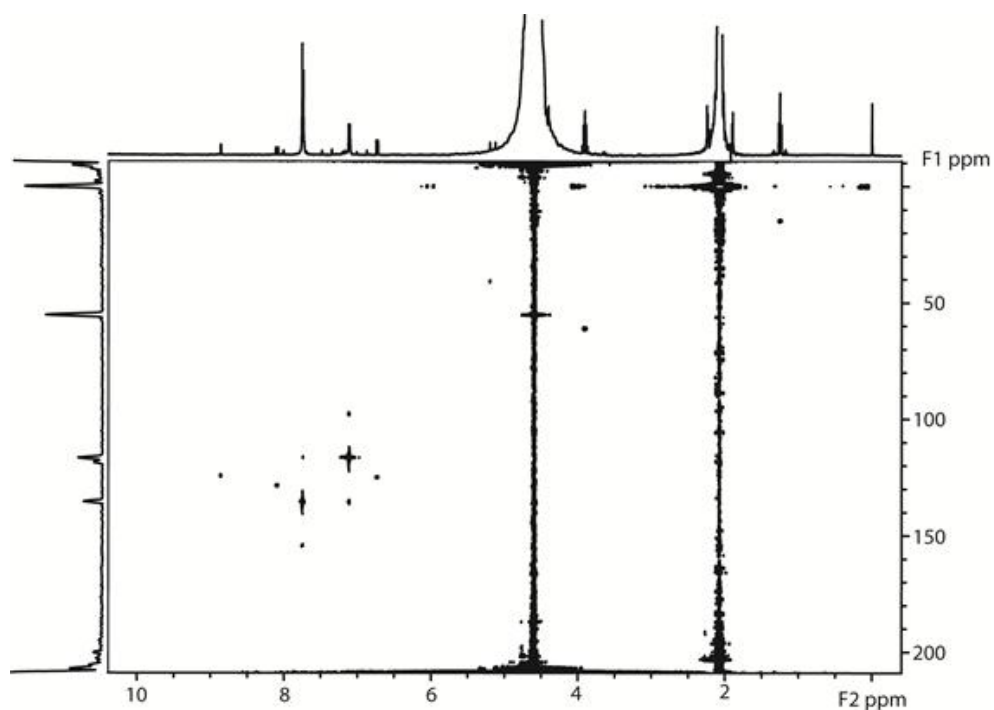


Tabela A.7. Dados de RMN (600 MHz, H₂O/D₂O a pH 8,5 e 25 °C) das espécies 4(5)HMZ e do intermediário 4(5)HMZnPI.

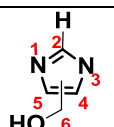
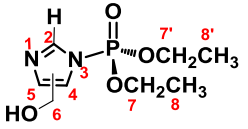
	1	2	3	4	5	6	7/7'	8/8'
 4(5)HMZ	δ_{H}	7,73 s (1H)		7,11 s (1H)		4,60 d (2H)		
	δ_{C}		139,0	120,2	139,6	58,7		
 4(5)HMZnPI	δ_{H}	8,03 d (1,4, 1H)		7,34 s (1H)		4,58 s (2H)	4,27 dq (8,8, 7,0, 4H)	1,34 td (7,1, 0,9, 6H)
	δ_{C}		143,1		119,9	60,7	69,7	18,0
	δ_{P}					-5,7		

Figura A.29. Espectro de massas no modo negativo adquirido durante a reação do MMZ a $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ com DEDNPP $7,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em pH 10,5 a $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

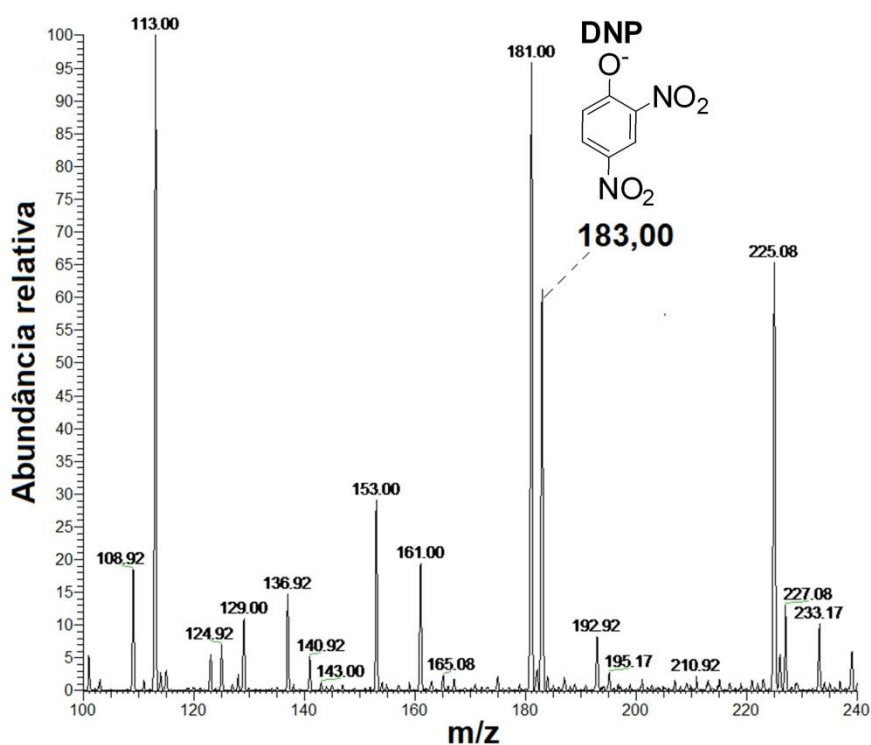


Figura A.30. Espectro de massas no modo negativo adquirido durante a reação do 4(5)HMZ a $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ com DEDNPP $7,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em pH 8,5.

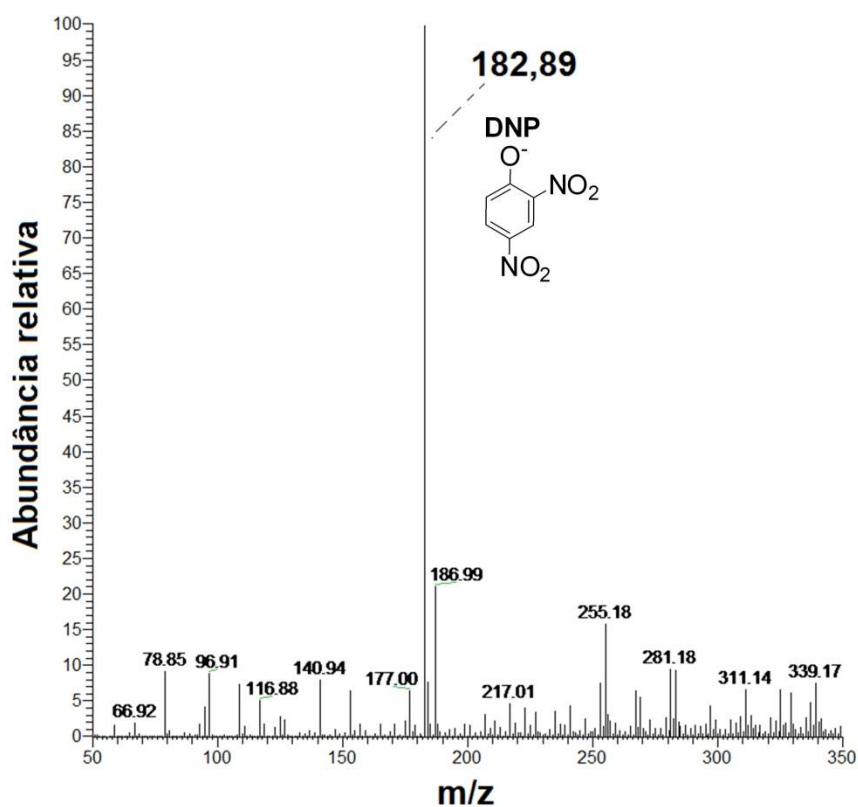
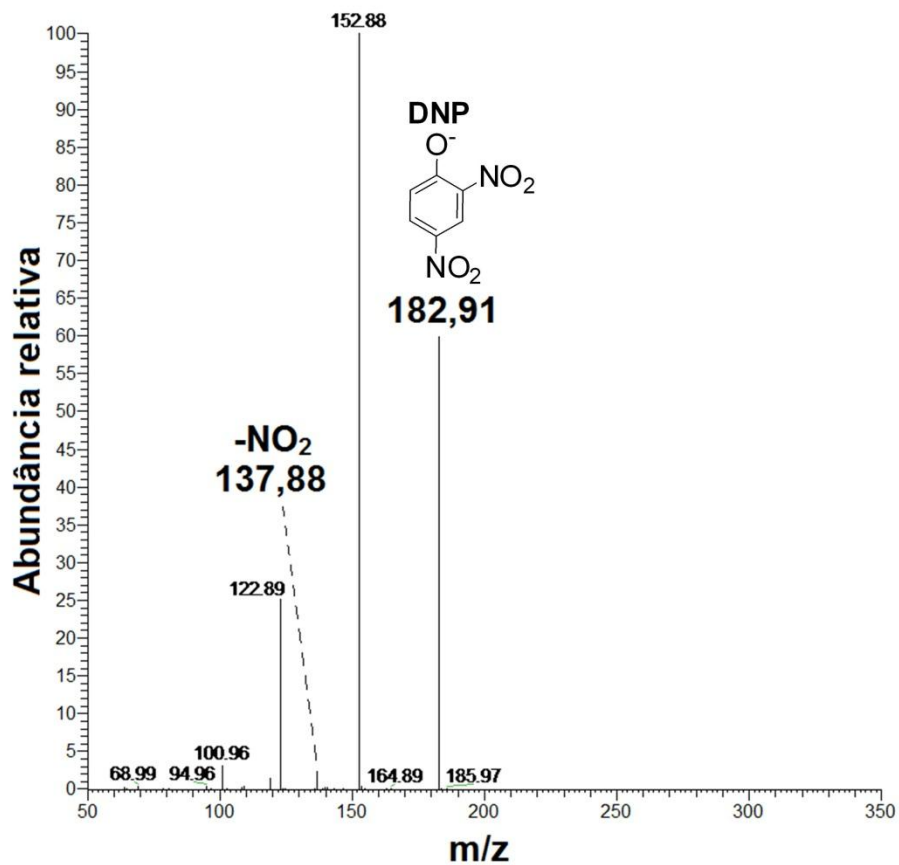


Figura A.31. ESI-MS/MS do sinal em m/z 183 Da (DNP) obtido da reação do 4(5)HMZ a $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ com DEDNPP $7,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em pH 8,5.



B. Dados teóricos

A seguir estão mostradas as estruturas dos ET referentes ao ataques do MMZ aniônico ao DEDNPP e do ataque pelo oxigênio do 4(5)HMZ ao triéster. Além disso, são apresentadas as coordenadas cartesianas dos mínimos e ET mais relevantes referentes a todas as reações dos derivados de IMZ com DEDNPP obtidos pelos cálculos teóricos em nível B3LYP utilizando conjunto de base 6-31+G(d,p).

Esquema A.1. Mecanismos propostos para a reação do MMZ aniônico com DEDNPP via $S_N2(P)$ e S_NAr .

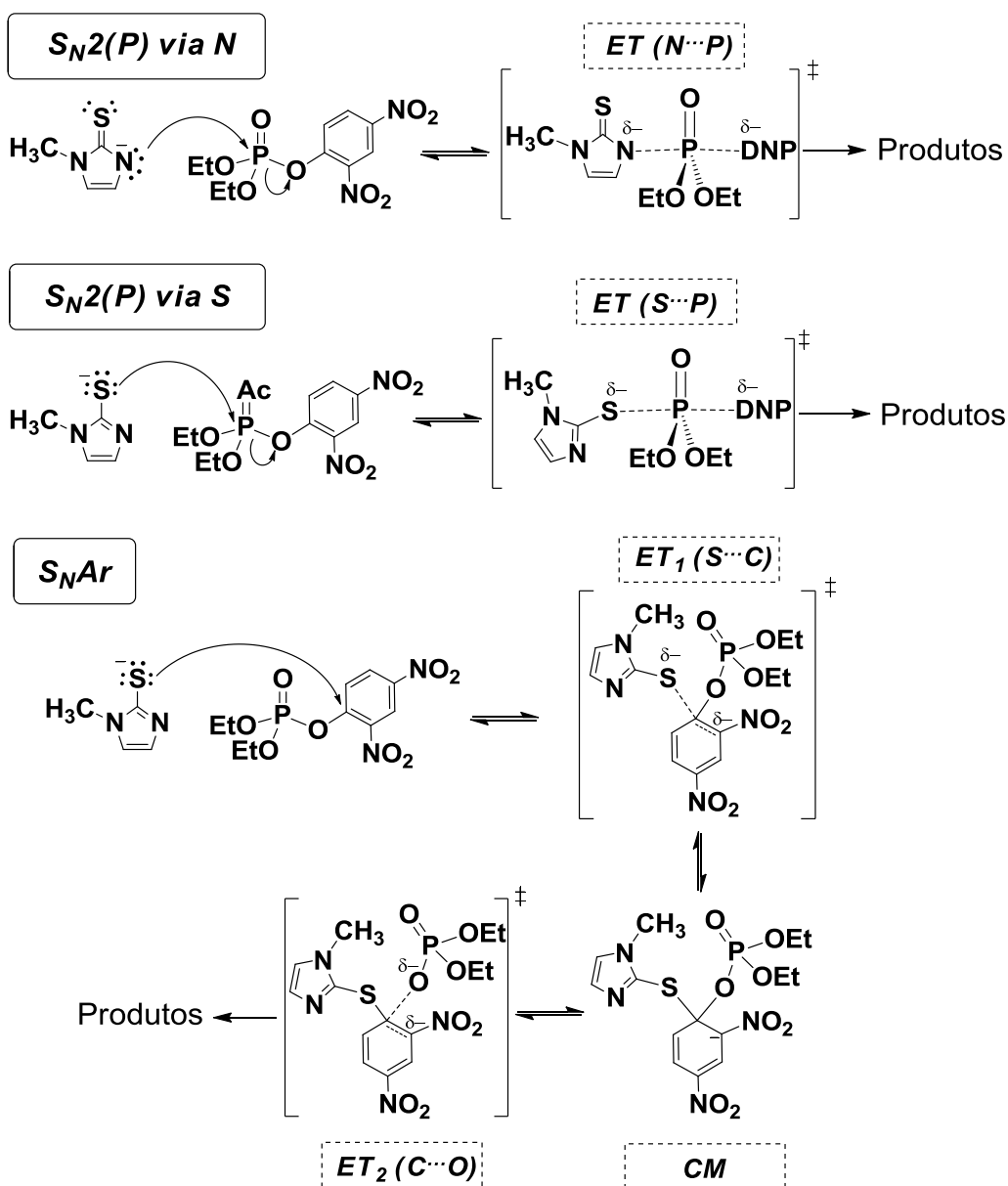


Figura A.32. Estruturas dos ET e intermediário CM da reação com MMZ aniônico com DEDNPP, referentes aos ataques do nitrogênio ao fósforo ($N\cdots P$), enxofre ao fósforo ($S\cdots P$), e enxofre ao carbono aromático ($S\cdots C$, CM, $C\cdots O$), de acordo com o Esquema A.1.

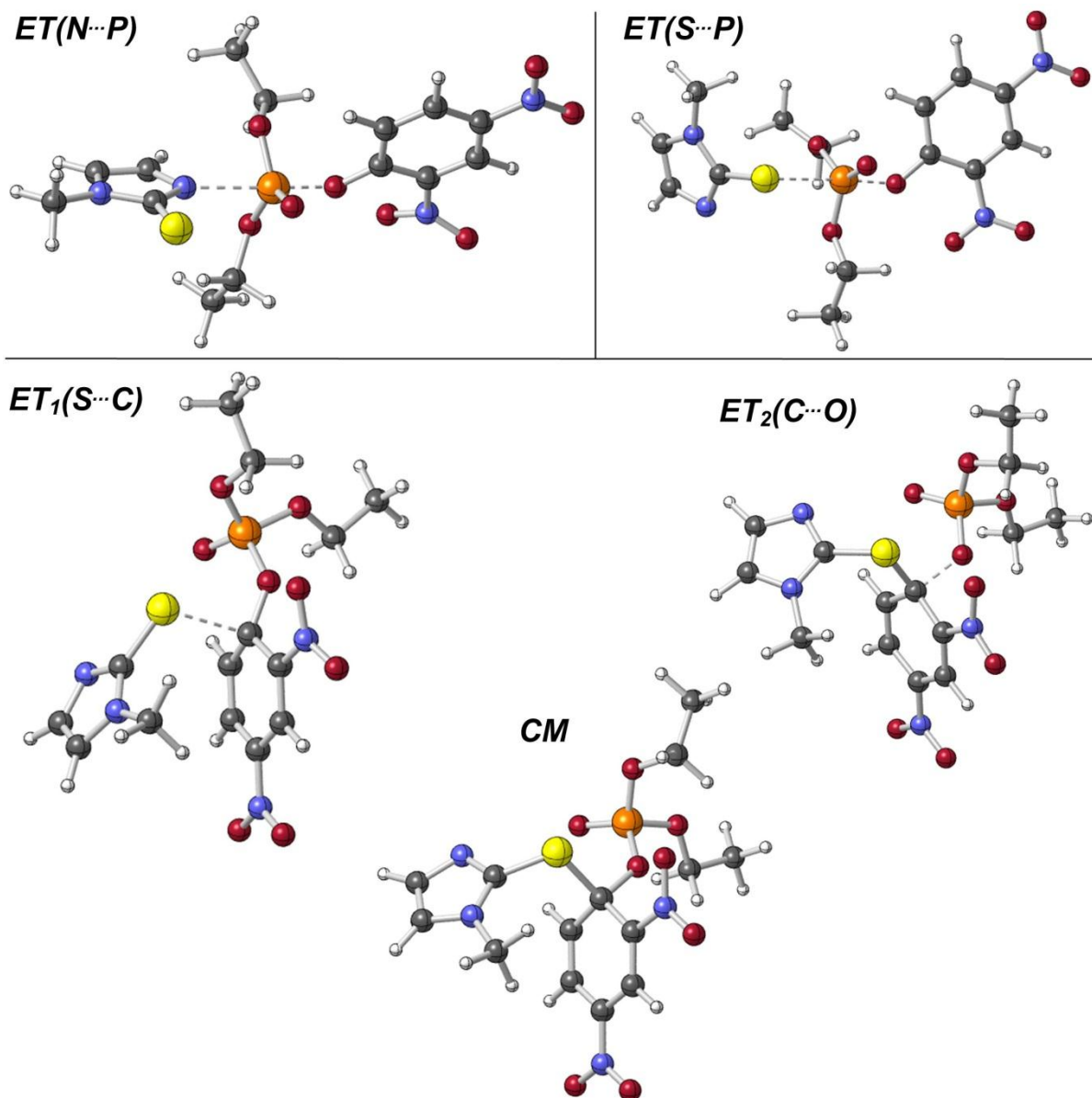
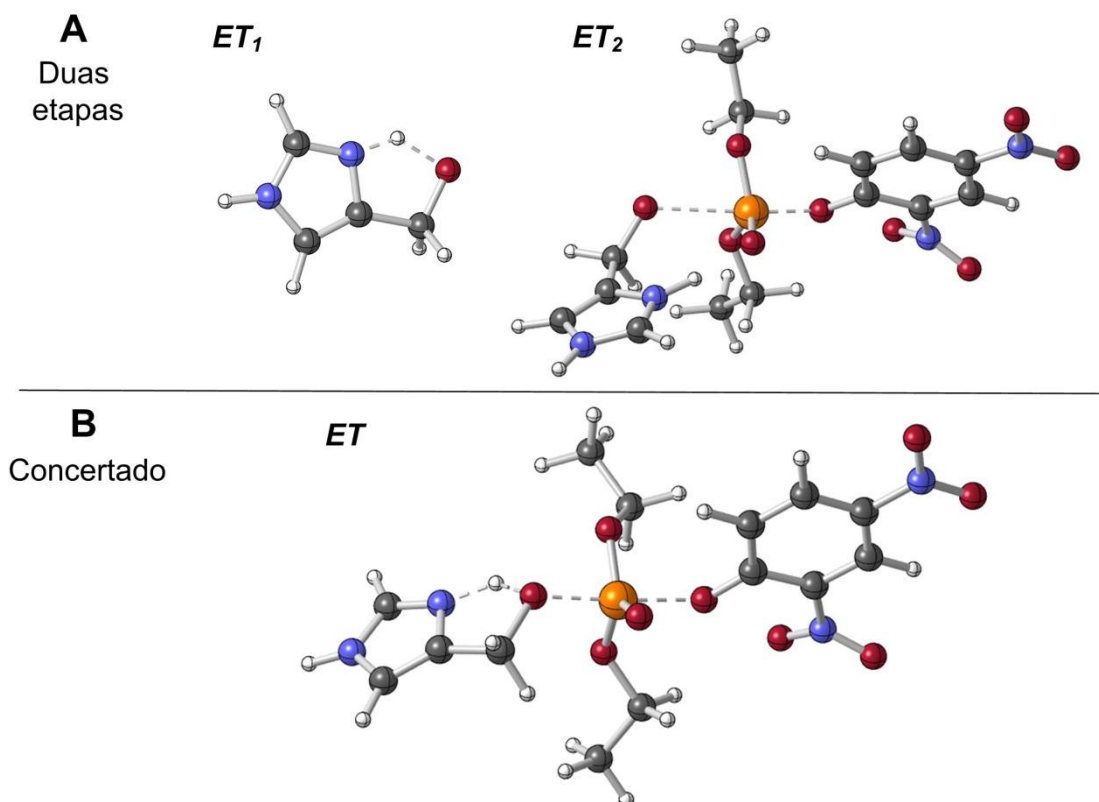


Figura A.33. Estruturas dos ET referentes à reação do 4(5)HMZ com DEDNPP em mecanismo de duas etapas (A) e concertado (B).



B.1. Coordenadas cartesianas (xyz) da conformação mais estável do DEDNPP

P	-2,00113500	0,44021400	0,74125500
O	-1,59784900	0,33956900	2,17054700
O	-3,25642900	-0,38306400	0,23937200
O	-2,30242900	1,93049200	0,29906400
O	-0,84267900	-0,14660100	-0,28156800
C	-3,41242900	-1,83186200	0,48986600
H	-2,54796300	-2,34065800	0,05725500
H	-3,42649000	-1,98069400	1,57182400
C	-2,65961800	2,31034000	-1,08396500
H	-3,63158900	1,86468900	-1,30522500
H	-1,90304500	1,89294600	-1,75262800
C	-4,70585800	-2,26350400	-0,16022700
H	-4,84850000	-3,33475600	0,01638600
H	-5,55925500	-1,72775900	0,26639100
H	-4,67932600	-2,09296200	-1,24076600
C	-2,69831100	3,81912200	-1,14773500
H	-2,96178500	4,11877800	-2,16759400
H	-3,45054900	4,22526600	-0,46468900
H	-1,72284400	4,24976800	-0,90251000
C	0,49865800	0,05454500	-0,15824000
C	1,38176600	-1,03636200	-0,31117400
C	1,03220600	1,32343400	0,09735700
C	2,75795400	-0,87151300	-0,19834200
C	2,40429000	1,50772100	0,18998300

H	0,36389700	2,16838500	0,21268400
C	3,24979100	0,40478100	0,04146200
H	3,42123300	-1,71846700	-0,31306400
H	2,81187600	2,49353400	0,37554600
N	0,89990700	-2,38871700	-0,58686200
O	1,57518700	-3,33161900	-0,16007800
O	-0,13439600	-2,53042500	-1,24174700
N	4,69349500	0,58996300	0,14012800
O	5,12621700	1,73671600	0,29772700
O	5,42073300	-0,40634400	0,06428500

B.2. Coordenadas cartesianas (xyz) do ET da reação do MMZ neutro via ataque do nitrogênio ao fósforo

P	-0,89213400	0,23536400	0,11655300
O	-0,68848900	-0,65600400	-1,08090200
O	-1,42576200	1,74512700	0,06832200
O	-0,91078000	-0,32970900	1,61212800
O	0,78388500	0,89671800	0,21176900
C	-2,03429600	2,31529800	-1,13873900
H	-1,29227300	2,28292800	-1,94093300
H	-2,89506500	1,70061600	-1,41443500
C	-0,34451600	0,36409700	2,78189600
H	-0,67782200	1,40391400	2,75916200
H	0,74371200	0,32879700	2,70933400
C	-2,44267800	3,73425700	-0,81111800
H	-2,90308900	4,18381600	-1,69717300
H	-3,17261100	3,75398600	0,00404100
H	-1,57585500	4,33964100	-0,52907900
C	-0,84459700	-0,35828300	4,01322800
H	-1,93657800	-0,32989200	4,07496200
H	-0,51438300	-1,40167000	4,01919500
H	-0,43534600	0,13617200	4,90068300
C	1,91335500	0,21563200	0,11983400
C	3,11779100	0,88852900	-0,24965100
C	2,00814300	-1,17659800	0,36343300
C	4,32641000	0,21371100	-0,38528500
C	3,20759700	-1,85045800	0,25232300
H	1,11939800	-1,72136000	0,65217300
C	4,36393500	-1,14904400	-0,12445500
H	5,21956000	0,75299700	-0,67065900
H	3,25596900	-2,91250100	0,45826500
N	3,14461400	2,31789500	-0,52044300
O	4,01774900	2,74459100	-1,29090800
O	2,32034700	3,05475100	0,03028700
N	5,62433500	-1,85056900	-0,23727600
O	5,64537000	-3,06795000	-0,00244700
O	6,63675700	-1,21313400	-0,56302800
C	-5,10104000	-0,25398300	0,95346900
C	-3,82549800	0,17329900	1,17366300
C	-3,77874300	-1,03807100	-0,63864900
N	-5,06468100	-1,02075400	-0,20158300
H	-3,44443400	0,79711000	1,96724600
N	-2,99884400	-0,32202700	0,17799600
H	-6,02088400	-0,09230400	1,49394200
S	-3,30252900	-1,92326000	-2,08332600
H	-2,00340500	-1,52928500	-1,92465600
C	-6,19291500	-1,74043800	-0,79154100
H	-6,29344200	-1,48968400	-1,85002400

H	-6,05920500	-2,81949500	-0,68002200
H	-7,10005500	-1,43670600	-0,27017500

B.3. Coordenadas cartesianas (xyz) do ET da reação do MMZ neutro via ataque do enxofre ao fósforo

P	-0,92374300	0,01847000	-0,71255500
O	-0,22509400	-0,29789800	-2,00499800
O	-1,44860100	1,47744300	-0,27763400
O	-1,11763300	-0,97064700	0,52738000
O	0,84943800	0,68434500	0,10753400
C	-1,29650700	2,62907900	-1,17972200
H	-0,23074800	2,76267400	-1,37933100
H	-1,81821400	2,40077700	-2,11344800
C	-0,78857500	-0,69581800	1,93946700
H	-0,97719000	0,35929800	2,14268600
H	0,27101800	-0,91235900	2,07963300
C	-1,89513000	3,83036400	-0,48436400
H	-1,80331500	4,70043800	-1,14301600
H	-2,95695200	3,67220000	-0,26990900
H	-1,37015100	4,04915500	0,45044400
C	-1,66292700	-1,59843800	2,78118500
H	-2,72498000	-1,38690100	2,62211200
H	-1,47207800	-2,65279700	2,55785800
H	-1,43018600	-1,42431400	3,83745500
C	2,00654100	0,11912800	0,05367400
C	3,22932500	0,86435400	0,25206900
C	2,17364300	-1,27928800	-0,21608700
C	4,48342300	0,26556100	0,17275900
C	3,40928800	-1,87320200	-0,28274200
H	1,28513200	-1,87961000	-0,36172100
C	4,57135400	-1,09511700	-0,08548200
H	5,37466200	0,85890900	0,32425600
H	3,49475400	-2,93540000	-0,47643300
N	3,21564500	2,28373900	0,52428200
O	4,25179000	2,93744600	0,30135900
O	2,19101100	2,81247200	0,97769000
N	5,86530900	-1,71337700	-0,14387500
O	5,93734800	-2,91958600	-0,44127100
O	6,87605200	-1,03094000	0,10295500
S	-2,97695400	-0,66368300	-1,62257100
C	-4,10911400	-0,41966600	-0,32527700
N	-5,15056100	-1,22655900	-0,01841300
N	-4,15502600	0,61807500	0,53664900
C	-5,84997100	-0,68256500	1,05073400
C	-5,50565000	-2,46407900	-0,71810000
C	-5,21547400	0,46645700	1,40879800
H	-3,45685900	1,35710200	0,54692700
H	-6,72523900	-1,16663200	1,45391500
H	-4,63556300	-3,12033400	-0,76983900
H	-6,29835700	-2,95330500	-0,15423400
H	-5,86103400	-2,24029500	-1,72593400
H	-5,42069400	1,17843400	2,19194600

B.4. Coordenadas cartesianas (xyz) do ET₁ da reação do MMZ neutro via ataque do enxofre ao carbono aromático

P	2,16547100	-0,13949600	-0,94109300
O	1,75614200	0,27800100	-2,31341100
O	3,27700000	-1,27029700	-0,81727400
O	2,77038200	1,08625200	-0,12754000
O	0,98180800	-0,80548100	-0,04276700
C	3,09692400	-2,60221300	-1,42497000
H	2,26079800	-3,08798900	-0,91623600
H	2,85285600	-2,46175500	-2,48078000
C	3,42545000	0,96314700	1,19305300
H	3,19291800	-0,01504500	1,61794300
H	2,95814400	1,73517200	1,80536200
C	4,38787300	-3,36642300	-1,24455100
H	4,27172300	-4,36293800	-1,68362400
H	5,21828900	-2,86233700	-1,74822900
H	4,63056300	-3,48471200	-0,18402600
C	4,91433400	1,18470100	1,04514400
H	5,37547500	1,14411900	2,03825000
H	5,37332200	0,41260200	0,42110500
H	5,12361500	2,16705200	0,61053700
C	-0,37694200	-0,43614400	0,14399500
C	-1,10109700	-1,50640400	0,86671900
C	-1,08276500	0,02742400	-1,06301500
C	-2,38659300	-1,89880100	0,52753300
C	-2,33979900	-0,36619500	-1,37707700
H	-0,56165800	0,72540200	-1,70513200
C	-3,02852000	-1,32461300	-0,56367900
H	-2,88599600	-2,64435400	1,13132900
H	-2,82090600	0,02227800	-2,26608900
N	-0,52305700	-2,07956900	2,02460900
O	-1,02435000	-3,11170400	2,52686200
O	0,47308300	-1,52123400	2,53551100
N	-4,34360000	-1,71145000	-0,88045100
O	-4,91190400	-1,18220100	-1,86842700
O	-4,93187100	-2,57261100	-0,17915700
S	-0,26740000	1,19655400	1,51575500
C	-0,52680400	2,56949300	0,48394800
N	-1,68581600	3,22103000	0,21955800
N	0,44951100	3,25432400	-0,15541500
C	-1,42319900	4,30838600	-0,58977100
C	-3,02679300	2,85741000	0,68738300
C	-0,07901500	4,32652000	-0,82849600
H	1,42440500	2,96302300	-0,15370400
H	-2,20847900	4,96898900	-0,92238700
H	-3,65991600	2,64100900	-0,17411600
H	-2,95560100	1,97927800	1,32544100
H	-3,44303900	3,69307500	1,25224900
H	0,52992200	5,00085400	-1,40935000

B.5. Coordenadas cartesianas (xyz) do intermediário CM da reação do MMZ neutro via ataque do enxofre ao carbono aromático

P	-2,32745000	0,14353200	0,62151400
O	-1,94204400	1,35925500	1,40602500
O	-3,12969600	-0,97971000	1,41639100
O	-3,30922000	0,52442400	-0,56681600
O	-1,09229900	-0,70651100	0,00439600

C	-2,51840400	-1,70592500	2,54396100
H	-1,86873300	-2,47450900	2,11880500
H	-1,91802600	-1,00309700	3,12695600
C	-3,88694000	-0,46641600	-1,49579900
H	-4,37737000	-1,23968300	-0,90068600
H	-3,06428100	-0,90311800	-2,06542100
C	-3,63572200	-2,30127000	3,36949500
H	-3,19968700	-2,87254300	4,19577100
H	-4,27505900	-1,51963400	3,79080100
H	-4,25014500	-2,98019900	2,77004800
C	-4,86740500	0,26335600	-2,38484100
H	-5,30544400	-0,45228600	-3,08861300
H	-5,67700800	0,70769900	-1,79776400
H	-4,36919100	1,05016000	-2,95963400
C	0,28649200	-0,29907900	-0,23014600
C	0,93052000	-1,33922800	-1,08805600
C	1,00251600	-0,11782600	1,06250900
C	2,11422800	-1,97461200	-0,74934600
C	2,14914500	-0,75954400	1,37469100
H	0,53838500	0,53912700	1,78686300
C	2,74932400	-1,68532700	0,45259700
H	2,54357000	-2,68614400	-1,44171900
H	2,61139800	-0,59507600	2,34019300
N	0,35523200	-1,63069400	-2,33952400
O	0,78801200	-2,58257900	-3,03212800
O	-0,58265800	-0,90265400	-2,74598300
N	3,96401100	-2,31264600	0,76586500
O	4,52639900	-2,04237100	1,85896800
O	4,47956800	-3,13092200	-0,03989600
S	0,21794300	1,39051800	-1,27202500
C	0,83939400	2,57144800	-0,14377500
N	2,04147800	3,19115800	-0,19714200
N	0,14384400	3,14424800	0,85872200
C	2,08793100	4,16049000	0,78295300
C	3,12805100	2,90432300	-1,14319800
C	0,89877900	4,11817900	1,45737500
H	-0,76476300	2,76877200	1,15962500
H	2,95647100	4,78520800	0,91959400
H	4,02063400	3,41538300	-0,78571100
H	3,30926200	1,83055800	-1,17532700
H	2,86868700	3,27142900	-2,13754600
H	0,54204300	4,68932500	2,29984700

B.6. Coordenadas cartesianas (xyz) do ET₂ da reação do MMZ neutro via ataque do enxofre ao carbono aromático

P	1,75613400	-0,95289700	-0,83200200
O	1,45035100	-0,56067500	-2,24851100
O	2,45379500	-2,39526300	-0,66671600
O	2,89429800	0,04248200	-0,26436500
O	0,54386900	-0,99404500	0,17907800
C	1,73643800	-3,61819600	-1,04591900
H	0,92526900	-3,77002500	-0,32871500
H	1,31270100	-3,47741800	-2,04452200
C	3,49670600	-0,11747500	1,06931800
H	2,85154700	-0,75203500	1,68133400
H	3,50142600	0,88697100	1,49677000
C	2,72566000	-4,76236800	-1,02301100
H	2,20898500	-5,68692000	-1,30166600

H	3,53875900	-4,59482300	-1,73625500
H	3,15175800	-4,89524800	-0,02357000
C	4,90059400	-0,67390000	0,95035300
H	5,34742600	-0,72205100	1,94976400
H	4,89700800	-1,68208900	0,52709900
H	5,52685500	-0,02807100	0,32674800
C	-0,70152200	0,21431500	0,43198400
C	-1,64995800	-0,55501000	1,24813600
C	-1,22810700	0,58807900	-0,87966000
C	-2,84206700	-1,05579700	0,73635200
C	-2,40400700	0,10744900	-1,36050800
H	-0,62611300	1,22485000	-1,51360000
C	-3,22229300	-0,74352400	-0,55861800
H	-3,47001000	-1,67037100	1,36688700
H	-2,73181400	0,38576300	-2,35434300
N	-1,31831100	-0,88483400	2,58345000
O	-2,07793800	-1,60632600	3,26323700
O	-0,25293500	-0,42770500	3,05831300
N	-4,44638200	-1,24458000	-1,06941500
O	-4,78387500	-0,93609900	-2,23402700
O	-5,16077200	-1,98264600	-0,35498600
S	0,20994700	1,54804300	1,35509000
C	0,55083700	2,73338200	0,09946800
N	-0,14732800	3,85142400	-0,20150200
N	1,70524700	2,79079100	-0,59584900
C	0,56814000	4,59234000	-1,11660900
C	-1,48964000	4,20073800	0,27926300
C	1,73482400	3,92292700	-1,36561700
H	2,40501500	2,04505600	-0,57768800
H	0,19305700	5,52533400	-1,50697500
H	-2,23580600	3,82817900	-0,42480100
H	-1,64972200	3,75643100	1,26028500
H	-1,55248000	5,28597500	0,35176900
H	2,56441800	4,16011200	-2,01250000

B.7. Coordenadas cartesianas (xyz) do ET da reação do MMZ aniônico via ataque do nitrogênio ao fósforo

P	-0,81298300	0,20032700	-0,05565900
O	-0,67341800	-0,68197200	-1,25093100
O	-1,36452800	1,70109400	-0,07497200
O	-0,82094000	-0,40125200	1,42504000
O	0,85727600	0,86974800	0,04875300
C	-2,05089400	2,26203600	-1,24378300
H	-1,35507700	2,24223500	-2,08686100
H	-2,91376800	1,63064400	-1,46691900
C	-0,33100500	0,31372600	2,61531700
H	-0,71597100	1,33554800	2,58921800
H	0,75969100	0,33653700	2,57374600
C	-2,46251600	3,67413600	-0,89109300
H	-2,97854500	4,11732100	-1,74937800
H	-3,14738600	3,68124000	-0,03741700
H	-1,59194300	4,29407800	-0,65559300
C	-0,82366200	-0,43843200	3,83173200
H	-1,91662500	-0,45767700	3,87235900
H	-0,44856100	-1,46661100	3,83780500
H	-0,45299700	0,06701800	4,72998500
C	1,98779700	0,18512000	0,00909200
C	3,22050900	0,87546100	-0,19811800

C	2,06024100	-1,22309500	0,14428300
C	4,43474100	0,20582400	-0,29735800
C	3,26427500	-1,89453700	0,07309500
H	1,15147000	-1,78461900	0,31085200
C	4,44852700	-1,17495300	-0,15121800
H	5,34849100	0,76004300	-0,46447200
H	3,29375200	-2,97048900	0,19157000
N	3,27049400	2,32389200	-0,32852800
O	4,18082900	2,81145000	-1,01444100
O	2,42941600	3,01273400	0,25774400
N	5,71009200	-1,87765000	-0,22906400
O	5,70745400	-3,11091600	-0,09913000
O	6,74771000	-1,22707700	-0,42561300
C	-5,05330700	-0,09005600	1,15788800
C	-3,73150700	0,24398300	1,17778200
C	-4,01031400	-1,02973900	-0,60137500
N	-5,22769100	-0,89004600	0,03943000
H	-3,20976100	0,86149300	1,89351400
N	-3,08190200	-0,33449400	0,10041700
H	-5,87149000	0,15782400	1,81741500
S	-3,83529400	-1,97278400	-2,04801300
C	-6,48259200	-1,50869900	-0,35863400
H	-6,75700100	-1,20808900	-1,37264200
H	-6,40425800	-2,59890500	-0,32854600
H	-7,25968100	-1,18497100	0,33540100

B.8. Coordenadas cartesianas (xyz) do ET da reação do MMZ aniônico via ataque do enxofre ao fósforo

P	-0,77449800	0,41378300	-0,56422000
O	-0,22561500	0,15698300	-1,94040400
O	-1,31147700	1,83195500	-0,03494600
O	-1,21095300	-0,72442900	0,47449300
O	0,82465300	0,78193100	0,25054600
C	-1,18593700	3,02649200	-0,87240700
H	-0,12526400	3,18670500	-1,08704700
H	-1,72421200	2,84228100	-1,80624300
C	-0,95648600	-0,66204000	1,92775400
H	-1,18817000	0,34636900	2,27637000
H	0,10110300	-0,87261800	2,09612600
C	-1,78170300	4,18741800	-0,10654200
H	-1,69350700	5,09595200	-0,71158500
H	-2,84171900	4,01601800	0,10451500
H	-1,25334100	4,35074900	0,83790400
C	-1,84227700	-1,69820700	2,58248700
H	-2,90124000	-1,47915500	2,41702800
H	-1,62151300	-2,70107600	2,20352800
H	-1,65164700	-1,69058700	3,66131200
C	1,95160400	0,11312400	0,11531900
C	3,20738200	0,77798300	0,27388900
C	1,99872400	-1,27247200	-0,18605400
C	4,41947800	0,10672500	0,14464400
C	3,19477600	-1,94985200	-0,29853100
H	1,06831300	-1,81084900	-0,31122500
C	4,40356100	-1,25403800	-0,12798000
H	5,35173100	0,64118100	0,26947500
H	3,20230700	-3,01223700	-0,50841300
N	3,28718000	2,20135900	0,55890700
O	4,30762000	2,80723700	0,19608300

O	2,35748500	2,75594800	1,15458200
N	5,65834800	-1,96324600	-0,23005700
O	5,63383400	-3,16858100	-0,52225200
O	6,71426900	-1,34647700	-0,02160300
S	-3,13473700	0,00993300	-1,68027100
C	-4,25830100	-0,36807200	-0,38892400
N	-4,79309700	-1,62764200	-0,21917500
N	-4,73633700	0,46705400	0,54363000
C	-5,64016500	-1,57925900	0,87224400
C	-4,55521800	-2,80090900	-1,05135100
C	-5,58623500	-0,28694300	1,32850000
H	-6,18838500	-2,44794500	1,20632700
H	-5,07639900	-3,64974900	-0,60689600
H	-4,93326200	-2,64109400	-2,06453000
H	-3,48719600	-3,02194700	-1,10316400
H	-6,11073200	0,14340800	2,17075400

B.9. Coordenadas cartesianas (xyz) do ET₁ da reação do MMZ aniônico via ataque do enxofre ao carbono aromático

P	-2,62482400	-0,20845600	-0,89045400
O	-2,17092600	-0,50873600	-2,27764300
O	-3,79352900	0,86498300	-0,73135300
O	-3,20821100	-1,48922100	-0,16236400
O	-1,49678400	0,42903500	0,10284300
C	-3,64039700	2,23224500	-1,25742200
H	-2,84771200	2,72096400	-0,68513300
H	-3,34229700	2,16126700	-2,30644800
C	-3,72551100	-1,50696100	1,21997300
H	-4,14818300	-0,52697800	1,44901700
H	-2,87306700	-1,69959500	1,87390600
C	-4,96725600	2,93848200	-1,10056700
H	-4,87116600	3,96002000	-1,48327800
H	-5,75299200	2,43083200	-1,66845500
H	-5,26456800	2,99094200	-0,04867600
C	-4,76614500	-2,59998700	1,30572300
H	-5,13944600	-2,65353700	2,33401800
H	-5,61120800	-2,39387900	0,64190400
H	-4,33727800	-3,57275000	1,04603400
C	-0,11168600	0,47444400	0,00990000
C	0,56589100	1,01745000	1,17435500
C	0,47426900	0,79446600	-1,26615000
C	1,80762700	1,63427800	1,05822500
C	1,68960400	1,40366500	-1,37197000
H	-0,07262500	0,50718200	-2,15431500
C	2,37917500	1,81562200	-0,19473500
H	2,31795100	1,97107000	1,94936700
H	2,11828200	1,60200700	-2,34623300
N	0,04465400	0,86042600	2,49228900
O	0,61238500	1,44681700	3,44440400
O	-0,95279600	0,13762900	2,67814400
N	3,64639400	2,44312800	-0,29596000
O	4,14241400	2,61986300	-1,43301200
O	4,24571000	2,80940200	0,74225800
S	0,30536000	-1,95178300	0,17679000
C	1,86998900	-2,15394400	-0,55402900
N	3,06356600	-2,12070700	0,14501100
N	2,10109900	-2,44084800	-1,84666800
C	4,07326700	-2,38838200	-0,74931300

C	3,27112100	-1,80698400	1,55491900
C	3,46202800	-2,58407200	-1,96539600
H	5,10964100	-2,41464400	-0,44538400
H	3,65689400	-0,79050500	1,67180200
H	2,32174800	-1,89555700	2,08140300
H	3,98702200	-2,51368200	1,98052100
H	3,92766100	-2,82188900	-2,91186900

B.10. Coordenadas cartesianas (xyz) do intermediário CM da reação do MMZ aniônico via ataque do enxofre ao carbono aromático

P	2,40231200	0,30868500	-0,83230700
O	1,94202000	1,01991500	-2,06230000
O	3,40881100	-0,91637800	-1,05362400
O	3,24816900	1,27639700	0,10783900
O	1,25138200	-0,39583500	0,05800300
C	3,00502100	-2,11230600	-1,80649000
H	2,22637800	-2,62144000	-1,23291100
H	2,59624900	-1,79217400	-2,76856300
C	3,77348500	0,87517500	1,42540700
H	3,73113200	-0,21210000	1,51429100
H	3,10846700	1,32205900	2,16676000
C	4,22956500	-2,98210900	-1,98228900
H	3,94642800	-3,88734400	-2,52970600
H	5,00515100	-2,46266600	-2,55344200
H	4,64159000	-3,28225900	-1,01379600
C	5,18963700	1,38831300	1,55618600
H	5,56495000	1,13659000	2,55418500
H	5,84767200	0,92756100	0,81317100
H	5,22723900	2,47599000	1,44013100
C	-0,17786900	-0,05799500	0,19280600
C	-0,72744600	-0,98780500	1,23433100
C	-0,86808600	-0,22493500	-1,12186000
C	-1,76339500	-1,87354000	0,99030300
C	-1,86510700	-1,10785600	-1,33647200
H	-0,50398100	0,39438100	-1,93149800
C	-2,34652900	-1,94921500	-0,27103800
H	-2,11836400	-2,50244800	1,79521000
H	-2,30978200	-1,19307200	-2,32052600
N	-0,18266700	-0,94946100	2,53231300
O	-0,60417700	-1,73280900	3,42256800
O	0,72106200	-0,11699700	2,78189500
N	-3,39074500	-2,85065800	-0,49800700
O	-3,91224200	-2,90964900	-1,64516200
O	-3,80360300	-3,59597400	0,43246400
S	-0,26186200	1,78222200	0,78849800
C	-1,49168500	2,49475900	-0,24735400
N	-2,84158700	2,42668400	0,01034400
N	-1,23932300	3,29655700	-1,28361400
C	-3,46662900	3,20122400	-0,93391600
C	-3,52859900	1,61546600	1,01317000
C	-2,46622000	3,73593400	-1,71444700
H	-4,54168800	3,30245800	-0,96243900
H	-3,79936200	0,64107100	0,59907400
H	-2,87713900	1,47509900	1,87529200
H	-4,43219300	2,14061600	1,32611000
H	-2,56561600	4,40998900	-2,55344300

B.11. Coordenadas cartesianas (xyz) do ET₂ da reação do MMZ aniônico via ataque do enxofre ao carbono aromático

P	2,31726700	0,06249400	-0,80077800
O	1,88141800	0,72024700	-2,07912500
O	3,33011300	-1,18184600	-1,00858600
O	3,25173300	1,08440000	0,01837900
O	1,18656400	-0,51312900	0,13693500
C	2,88458800	-2,40373100	-1,67834200
H	2,11026100	-2,86887200	-1,06152300
H	2,45584400	-2,13402600	-2,64807200
C	3,79997500	0,76345200	1,33833800
H	4,34604500	-0,18122500	1,26685100
H	2,96717400	0,64636000	2,03642600
C	4,08531600	-3,31070200	-1,83906500
H	3,77160300	-4,23839000	-2,32931100
H	4,85610600	-2,83879900	-2,45654800
H	4,51773700	-3,56590200	-0,86636300
C	4,71291700	1,89969100	1,74506400
H	5,13397600	1,68694300	2,73339100
H	5,53902500	2,01442700	1,03612300
H	4,16180200	2,84376300	1,80308900
C	-0,47106700	0,05068500	0,31419800
C	-0,94581200	-0,87588700	1,34996500
C	-1,09519100	-0,15838700	-0,99194700
C	-1,79818600	-1,93757600	1,07292800
C	-1,92680200	-1,19998200	-1,25140900
H	-0,84122500	0,53401500	-1,78333700
C	-2,28355400	-2,11723500	-0,21495300
H	-2,08160700	-2,61097300	1,87021000
H	-2,33620800	-1,32887800	-2,24567400
N	-0,47335200	-0,74096100	2,67873900
O	-0,91395600	-1,48983000	3,58118900
O	0,38301000	0,13683900	2,92005500
N	-3,15281200	-3,19814000	-0,48978200
O	-3,57963400	-3,34932200	-1,65841100
O	-3,48189900	-3,98432100	0,42943500
S	-0,28204600	1,82450300	0,82190600
C	-1,24132500	2,69382300	-0,37536500
N	-2,61044700	2,81081500	-0,31659900
N	-0,72780000	3,47309600	-1,32722900
C	-2,97439300	3,68366100	-1,31055600
C	-3,53402400	2,09474400	0,56312900
C	-1,80472200	4,08826900	-1,91480900
H	-4,00899600	3,93424300	-1,49355000
H	-3,70960200	1,08142800	0,19384300
H	-3,12166200	2,04602400	1,57159900
H	-4,47636600	2,64211800	0,58792800
H	-1,68441000	4,78535900	-2,73183400

B.12. Coordenadas cartesianas (xyz) do ET da reação do IMZ com DEDNPP

P	-1,39263700	-0,05376400	-0,19782400
O	-1,10074500	-0,50403100	-1,59675200
O	-2,12455600	1,31361900	0,19783900
O	-1,46560200	-1,06317900	1,03681400
O	0,18451100	0,66996500	0,22402600
C	-2,34966900	2,36396300	-0,80355400
H	-1,38817600	2,62334500	-1,25476600

H	-3,01581600	1,96115300	-1,57193200
C	-1,07673800	-0,71539700	2,41522400
H	-1,59015500	0,20833200	2,69181100
H	0,00198300	-0,55246600	2,43780200
C	-2,96767100	3,54529100	-0,09016500
H	-3,15094500	4,34315100	-0,81761200
H	-3,92312800	3,27186500	0,36798800
H	-2,29821300	3,93292400	0,68387400
C	-1,48334500	-1,87112600	3,30151700
H	-1,19058000	-1,64140200	4,33164800
H	-2,56555300	-2,03027300	3,27837900
H	-0,98013200	-2,79489000	2,99953900
C	1,38128900	0,12830300	0,04794200
C	2,53773000	0,96194100	0,07757200
C	1,59250500	-1,25190000	-0,18121600
C	3,81681200	0,45859000	-0,12781700
C	2,86149700	-1,76647800	-0,36262100
H	0,74291900	-1,92094300	-0,20651900
C	3,96897400	-0,90546600	-0,33827400
H	4,67156400	1,12122900	-0,10524900
H	2,99989200	-2,82868700	-0,52215100
N	2,43723800	2,39420800	0,31848000
O	3,29353400	3,12813800	-0,19534800
O	1,52575700	2,82198400	1,03299100
N	5,29947900	-1,44209300	-0,53056900
O	5,42130800	-2,65868500	-0,73548900
O	6,26782200	-0,66912000	-0,48683100
C	-5,63072800	-1,41924100	-0,21816800
C	-4,46607000	-1,06560800	0,41123600
C	-4,05792800	-1,01337100	-1,72269400
N	-5,35173000	-1,37814000	-1,56911100
H	-6,60398500	-1,69119000	0,15968300
H	-4,26436700	-0,98009000	1,46857400
H	-3,57785900	-0,90543400	-2,68292100
N	-3,49333400	-0,82045200	-0,53892500
H	-5,99565400	-1,59135300	-2,32179000

B.13. Coordenadas cartesianas (xyz) do ET da reação do 1MEI com DEDNPP

P	-1,13223100	0,02797600	-0,00345700
O	-0,93525200	-0,53849000	-1,37621100
O	-1,78071900	1,45663300	0,31689400
O	-1,18625600	-0,89457200	1,29729400
O	0,48838400	0,70944500	0,29073700
C	-2,12111400	2,37794300	-0,77442000
H	-1,22286300	2,55057100	-1,37352800
H	-2,88386100	1,89989300	-1,39534400
C	-0,72996800	-0,48000400	2,63554900
H	-1,24319800	0,44847900	2,89708100
H	0,34581400	-0,30157500	2,59331400
C	-2,62750800	3,65776800	-0,14758100
H	-2,89332000	4,36176900	-0,94310200
H	-3,51870500	3,47277000	0,45998100
H	-1,85882800	4,12061900	0,47876200
C	-1,07393300	-1,60217400	3,58908400
H	-0,73681200	-1,32714200	4,59412000
H	-2,15344100	-1,77726000	3,62328300
H	-0,57107000	-2,53031300	3,30014400
C	1,65621400	0,12256500	0,07060000

C	2,83015400	0,92215000	-0,05922100
C	1,81659600	-1,27732300	-0,05426600
C	4,07898300	0,36372300	-0,30719500
C	3,05602600	-1,84370500	-0,27922900
H	0,95057300	-1,91877100	0,03858500
C	4,18335300	-1,01728100	-0,40363700
H	4,94782900	1,00029900	-0,40632300
H	3,15685500	-2,91932500	-0,35380000
N	2,78153400	2,37297500	0,04865200
O	3,63075800	3,02717000	-0,57359400
O	1,91957800	2,89678000	0,76097100
N	5,48432600	-1,60931200	-0,63371100
O	5,55719200	-2,84031300	-0,76050600
O	6,47637900	-0,86835700	-0,69522400
C	-5,47027700	-0,94791800	0,27985000
C	-4,24989600	-0,62991900	0,81822000
C	-3,93718400	-0,94665900	-1,30467800
N	-5,25576000	-1,14682400	-1,07076300
H	-6,44960000	-1,05222200	0,72205200
H	-3,99755200	-0,40550000	1,84427900
H	-3,49097800	-1,03740300	-2,28355300
N	-3,29931900	-0,63838600	-0,18181400
C	-6,27219600	-1,48648700	-2,06535000
H	-7,00723900	-0,68162000	-2,13757800
H	-5,78641200	-1,62159300	-3,03193900
H	-6,77521000	-2,41292000	-1,78035300

B.14. Coordenadas cartesianas (xyz) do ET da reação do 2MEI com DEDNPP

P	-1,27959400	-0,07124900	-0,19613000
O	-1,10691900	-0,55444200	-1,60370100
O	-2,02401500	1,27743900	0,23212300
O	-1,16184800	-1,11425100	1,01174200
O	0,31347800	0,67724100	0,09072100
C	-1,64067300	2,62378000	-0,22888200
H	-0,74401900	2,92239800	0,31448700
H	-1,41821100	2,57553000	-1,29763400
C	-1,03676500	-0,68700000	2,41336100
H	-1,95187400	-0,15412800	2,68379800
H	-0,18581900	-0,00628800	2,49208200
C	-2,80644800	3,54303500	0,06239700
H	-2,54096300	4,55909000	-0,24884500
H	-3,70350600	3,23725500	-0,48419900
H	-3,03135200	3,56215900	1,13355200
C	-0,84176000	-1,92760200	3,25592300
H	-1,69309300	-2,60888300	3,16286700
H	0,07191300	-2,45900700	2,97256500
H	-0,75455100	-1,62860000	4,30585400
C	1,50552100	0,12778300	-0,07754100
C	2,67061300	0,93189700	0,10134700
C	1,71298800	-1,22039800	-0,45559800
C	3,95208500	0,43628600	-0,10367000
C	2,98412000	-1,73000300	-0,63827100
H	0,85979700	-1,86626200	-0,60730900
C	4,09968300	-0,89745600	-0,46231300
H	4,81214400	1,07745200	0,03621500
H	3,11678700	-2,76788800	-0,91761600
N	2,57670100	2,32635800	0,51211500
O	3,45046200	3,10701100	0,10859500
O	1,65597700	2,67295100	1,25773500

N	5,43140700	-1,42883500	-0,65270200
O	5,55231400	-2,61567100	-0,99051000
O	6,40400300	-0,68075300	-0,47321400
C	-5,28647900	-1,97178900	0,26675500
C	-3,98250300	-1,75833700	0,62126900
C	-4,35720800	-0,50896600	-1,13314000
N	-5,50307300	-1,17521300	-0,83937000
H	-3,42161200	-2,19338700	1,43339900
N	-3,41462200	-0,84854000	-0,25330300
H	-6,37137200	-1,09010000	-1,35458900
H	-6,05942800	-2,59533000	0,68815300
C	-4,22552300	0,41693600	-2,29246700
H	-5,21424900	0,69466600	-2,66640600
H	-3,69218300	1,32591800	-2,00541800
H	-3,67091100	-0,05743800	-3,10913800

B.15. Coordenadas cartesianas (xyz) do ET da reação do 4MEI com DEDNPP

P	-1,28452300	-0,04804600	-0,17969300
O	-1,08861000	-0,52190700	-1,58743500
O	-2,02497800	1,30216200	0,24968400
O	-1,18879300	-1,09902900	1,02435100
O	0,31276800	0,68715500	0,13364400
C	-1,63625600	2,64807900	-0,20815400
H	-0,70706100	2,92026200	0,29239300
H	-1,47055000	2,61114200	-1,28770600
C	-1,08098400	-0,68699900	2,43143700
H	-1,98431300	-0,12753300	2,68744000
H	-0,21027700	-0,03534300	2,53482300
C	-2,76456600	3,58765900	0,15708000
H	-2,49334800	4,60169100	-0,15586000
H	-3,69667200	3,30972100	-0,34344300
H	-2,93161500	3,59772700	1,23888700
C	-0,94445000	-1,94103800	3,26551300
H	-1,81392700	-2,59427700	3,14346700
H	-0,04087100	-2,49784700	2,99905100
H	-0,87457500	-1,65563600	4,32051200
C	1,49967000	0,13020500	-0,04529900
C	2,67287900	0,93025200	0,09799400
C	1,69384700	-1,22675400	-0,39979300
C	3,94782900	0,42163000	-0,11689000
C	2,95838200	-1,74841200	-0,59220500
H	0,83482700	-1,87079100	-0,52305600
C	4,08186500	-0,91984700	-0,45076800
H	4,81382300	1,06025200	-0,00510000
H	3,07979300	-2,79262300	-0,85244700
N	2,59544800	2,33505000	0,47523500
O	3,46977200	3,09834000	0,04078000
O	1,68740900	2,70831900	1,22358400
N	5,40707100	-1,46270800	-0,65386400
O	5,51553700	-2,65584000	-0,97344300
O	6,38670400	-0,71726200	-0,50413900
C	-3,91143500	-1,76619200	0,49689200
C	-4,39364500	-0,47643200	-1,20178900
H	-3,40406800	-2,25974300	1,31046900
N	-3,40585300	-0,81920200	-0,28401900
C	-4,21495300	0,55801600	-2,26566000
H	-5,12725600	0,63205600	-2,86369300
H	-4,00724500	1,54435500	-1,83820500
H	-3,38608900	0,30653500	-2,93503000

N	-5,17773700	-2,05177700	0,12742200
C	-5,50168800	-1,24679100	-0,94680400
H	-6,46673600	-1,29038300	-1,42735400
H	-5,77594600	-2,74418300	0,56132000

B.16. Coordenadas cartesianas (xyz) do ET da reação do 5MEI com DEDNPP

P	-1,09722000	0,03515100	-0,23172100
O	-0,82724000	-0,44489700	-1,62436700
O	-1,77934000	1,43034200	0,15324100
O	-1,21735400	-0,97136100	1,00098600
O	0,49831100	0,70054500	0,19213800
C	-2,01588800	2,45695500	-0,86939900
H	-1,05976300	2,69925200	-1,34129400
H	-2,69604400	2,04013100	-1,61759900
C	-0,85566600	-0,62849500	2,38793200
H	-1,36161500	0,30279400	2,65272100
H	0,22477800	-0,48155100	2,43514600
C	-2,61574000	3,65908000	-0,17565300
H	-2,80413800	4,44062000	-0,91932100
H	-3,56638900	3,40337000	0,30231500
H	-1,93276900	4,06050400	0,57934200
C	-1,29964300	-1,77843000	3,26333400
H	-1,03074600	-1,55260800	4,30084300
H	-2,38282200	-1,92362300	3,21173800
H	-0,80056000	-2,70846500	2,97399300
C	1,67848100	0,11782600	0,03153000
C	2,86160700	0,91076400	0,09529000
C	1,84541400	-1,26504700	-0,21328100
C	4,12634400	0,36696900	-0,09469600
C	3,09967700	-1,82071600	-0,37609800
H	0,97359600	-1,90293600	-0,26620500
C	4,23539300	-0,99908400	-0,31966500
H	5,00280700	0,99917000	-0,04647600
H	3,20374400	-2,88469800	-0,54862000
N	2,80505800	2,34199400	0,35927200
O	3,68964000	3,05559800	-0,13438200
O	1,90194100	2,78699900	1,07371400
N	5,55028300	-1,57923300	-0,49359200
O	5,63722200	-2,80500600	-0,65708400
O	6,54009900	-0,83288900	-0,47541700
C	-5,45953300	-0,99246300	-0,26015400
C	-4,28160400	-0,63437700	0,34891500
C	-3,79487200	-0,96841600	-1,73924200
N	-5,12212900	-1,19948500	-1,58744200
H	-4,11156400	-0,38802700	1,38700300
H	-3,27717000	-1,06163800	-2,68149400
N	-3,25574900	-0,62835100	-0,58002400
H	-5,75723200	-1,48463300	-2,32391600
C	-6,84596100	-1,15624000	0,26255000
H	-7,54311300	-0,46606200	-0,22622000
H	-7,21770100	-2,17458300	0,10140700
H	-6,86154900	-0,95335000	1,33613100

B.17. Coordenadas cartesianas (xyz) do ET₁ da 4HMZ com DEDNPP via oxigênio, referente a etapa de transferência intramolecular do próton no 4(5)HMZ, mostrado na Figura 33A do apêndice.

O	2.26991500	-0.61650200	0.00033100
C	1.71685200	0.68328300	0.00024300
H	2.01639900	1.26652400	0.88659300
H	2.01663200	1.26650300	-0.88604100
C	-0.98464300	1.16317500	-0.00014400
H	-1.23103500	2.21370100	-0.00018000
C	-1.39284100	-1.03294500	-0.00020500
H	-1.92860500	-1.96971600	-0.00029300
N	-1.96948100	0.18376400	-0.00029300
N	-0.07727200	-0.85709900	0.00000000
C	0.20516300	0.48687500	0.00003900
H	-2.97192800	0.34788900	-0.00044600
H	0.99930900	-1.28185700	0.00016900

B.18. Coordenadas cartesianas (xyz) do ET₂ da segunda etapa da reação do 4(5)HMZ pelo oxigênio aniônico com DEDNPP, mostrado na Figura 33A do apêndice.

P	-0.97596100	0.41763000	0.44675400
O	-1.16283100	-0.88342000	-0.27436700
O	-1.63216600	1.78858100	-0.01000700
O	-0.79009700	0.36602000	2.02120100
O	0.61989900	0.90027400	-0.00368500
C	-1.53536900	2.29802100	-1.39310300
H	-0.48269200	2.48953400	-1.60798800
H	-1.91357100	1.52403900	-2.06517200
C	-0.47632800	1.56018000	2.82550100
H	-1.30910000	2.25906500	2.72186500
H	0.43436500	2.01173800	2.42439500
C	-2.35973700	3.56173600	-1.46711300
H	-2.29562400	3.96119200	-2.48491100
H	-3.41176100	3.36498200	-1.23968300
H	-1.97904900	4.31988600	-0.77573300
C	-0.29800800	1.10932200	4.25660400
H	-0.08311100	1.98663700	4.87597000
H	-1.20820900	0.63457100	4.63521600
H	0.53736400	0.40889300	4.35090200
C	1.73380000	0.16438300	0.02806600
C	2.88613700	0.63853400	-0.65635500
C	1.83652700	-1.07644100	0.68984600
C	4.07100800	-0.08635800	-0.69209300
C	3.01740700	-1.79768500	0.67901900
H	0.98150300	-1.47387600	1.21955100
C	4.12806100	-1.29518200	-0.01131500
H	4.92895700	0.29906500	-1.22661800
H	3.08204800	-2.74264600	1.20401900
N	2.88113800	1.90946500	-1.37220000
O	3.59114000	2.00080000	-2.38226200
O	2.19460300	2.83925500	-0.94100000
N	5.36869500	-2.04673400	-0.02050600
O	5.39746400	-3.14334300	0.55395400
O	6.35114700	-1.56455700	-0.60061900
O	-3.31563500	0.09720900	1.28844000

C	-4.36331600	0.23998800	0.37828400
H	-5.30336700	0.58507900	0.84847200
H	-4.12941300	0.99306300	-0.40213300
C	-4.69837100	-1.04730500	-0.33716600
C	-5.87485400	-1.66121100	-0.67175800
N	-3.69061600	-1.86897100	-0.81718600
H	-6.90003100	-1.37970700	-0.49296400
N	-5.54394000	-2.82734700	-1.34508900
C	-4.21467300	-2.93642800	-1.41893700
H	-2.68954400	-1.65246600	-0.67630600
H	-6.19768100	-3.50709200	-1.71843200
H	-3.67051700	-3.74718400	-1.87701300

B.19. Coordenadas cartesianas (xyz) do ET da reação do 4(5)HMZ pelo oxigênio com DEDNPP em mecanismo concertado, mostrado na Figura 33B do apêndice.

P	-1.09469575	-0.23819796	-0.35043591
O	-0.61869075	-0.51505296	-1.75086291
O	-1.78251475	1.14689904	0.08739709
O	-0.96503875	-1.28574196	0.86496009
O	0.60981225	0.57904904	0.19011109
C	-1.31822675	2.47660904	-0.33022891
H	-0.64836575	2.84722704	0.44641909
H	-0.76313575	2.38131804	-1.26564291
C	-0.52252675	-0.96781296	2.22645309
H	-0.88377975	0.02825204	2.49106009
H	0.56857925	-0.97259796	2.24036009
C	-2.53471175	3.36143004	-0.49363591
H	-2.20341675	4.36823404	-0.77092291
H	-3.19781075	2.98861604	-1.28047191
H	-3.09961575	3.43396604	0.44130709
C	-1.09011975	-2.02893896	3.14455309
H	-0.74758875	-1.83133096	4.16604009
H	-2.18428975	-2.01724496	3.13823209
H	-0.74366175	-3.02606796	2.85467209
C	1.80697325	0.10829204	0.01749709
C	2.96387225	0.93913404	0.23047609
C	2.07542925	-1.23138096	-0.40074791
C	4.25937225	0.48148204	0.01741709
C	3.35625125	-1.69634896	-0.58889491
H	1.23983225	-1.89680996	-0.56808891
C	4.45198725	-0.83465096	-0.38120291
H	5.10039225	1.14078704	0.18518809
H	3.52375525	-2.72224496	-0.89332491
N	2.83807825	2.31110604	0.68027409
O	3.74636725	3.10854704	0.38987609
O	1.85266625	2.64336604	1.35007009
N	5.79206625	-1.31911996	-0.57064891
O	5.95453125	-2.50210196	-0.91676691
O	6.74683625	-0.54456296	-0.38506691
O	-2.75986275	-0.98666996	-0.58688791
C	-3.65060575	-0.50082096	-1.62957691
H	-3.34879675	0.49652204	-1.95856991
H	-3.62265975	-1.19049796	-2.47569691
C	-6.29982475	-0.24349196	-1.18272591
H	-6.82758475	0.04300604	-2.07835691
C	-6.04727575	-0.78541396	0.96538609
H	-6.29149375	-0.99739796	1.99467509
N	-6.94958275	-0.43682496	0.02559109

N	-4.84350075	-0.82166196	0.40975809
C	-4.98102375	-0.48807996	-0.91948091
H	-7.94594975	-0.33484196	0.18544909
H	-3.56335075	-1.01410596	0.32195109

B.20. Coordenadas cartesianas (xyz) do ET da reação do 5HMZ com DEDNPP

P	-0,82930600	0,15863300	-0,12250400
O	-0,52343600	-0,35861700	-1,49513400
O	-1,41398600	1,61411800	0,20263600
O	-1,10632600	-0,79844900	1,12504400
O	0,79563400	0,69315900	0,37432300
C	-1,33085000	2,68542300	-0,79837200
H	-0,28549600	2,79591900	-1,09966300
H	-1,92968600	2,38518300	-1,66334200
C	-0,64492200	-0,52293800	2,49843800
H	-0,84176200	0,52701000	2,72525300
H	0,42952800	-0,71035100	2,53800700
C	-1,86281700	3,94944600	-0,16144200
H	-1,81730600	4,76109300	-0,89526900
H	-2,90466400	3,82625200	0,15001100
H	-1,26286500	4,23700400	0,70744400
C	-1,40661500	-1,44730200	3,42121500
H	-1,06430900	-1,27650200	4,44755800
H	-2,48272100	-1,25396600	3,37940200
H	-1,22210900	-2,49628600	3,16916700
C	1,93734400	0,05245800	0,15908600
C	3,15532000	0,78864800	0,09294200
C	2,02212600	-1,34795100	-0,01687600
C	4,37604800	0,17435000	-0,16195200
C	3,23283900	-1,97280200	-0,24550800
H	1,11930600	-1,94199000	0,03780800
C	4,40440300	-1,20468400	-0,32253100
H	5,28127000	0,76415800	-0,21566800
H	3,27594100	-3,04820900	-0,36407300
N	3,18167600	2,23203600	0,28183800
O	4,05674600	2,87727000	-0,31257200
O	2,35460600	2,75395800	1,03548600
N	5,67438000	-1,85491600	-0,57020400
O	5,68849700	-3,08538300	-0,71854200
O	6,69920100	-1,16006000	-0,62673900
C	-5,22531900	-0,56634700	-0,43609800
C	-4,07045000	-0,35903800	0,27919100
C	-3,47303800	-0,53613400	-1,79909900
N	-4,81619000	-0,67388500	-1,75534200
H	-3,95691700	-0,22103900	1,34467300
H	-2,89724700	-0,58315200	-2,71038200
N	-2,99010400	-0,34504200	-0,57934800
H	-5,41590000	-0,84239800	-2,55520600
C	-6,64670500	-0,68580900	-0,00191300
H	-6,72078100	-0,37142800	1,04423700
H	-7,29243600	-0,03911400	-0,60212600
O	-7,18195100	-2,01446400	-0,16957500
H	-6,67665600	-2,61520000	0,39921300

B.21. Coordenadas cartesianas (xyz) do ET da reação do 4HMZ com DEDNPP

P	-1,18579700	-0,04919900	-0,03966400
O	-1,07062100	-0,59999100	-1,43523300
O	-1,91162300	1,32346100	0,33980400

O	-0,99905800	-1,03116800	1,21193100
O	0,41658600	0,70558700	0,12298200
C	-1,52553800	2,65146700	-0,17236600
H	-0,61583800	2,95916700	0,34319200
H	-1,32597000	2,56603800	-1,24315800
C	-0,75726800	-0,53065900	2,57510600
H	-1,62422000	0,06588700	2,87022800
H	0,12987600	0,10633200	2,55775200
C	-2,67902400	3,58771000	0,11260400
H	-2,41186100	4,59162100	-0,23452500
H	-3,58798700	3,27240900	-0,40841600
H	-2,88392300	3,64106900	1,18657200
C	-0,57070000	-1,73045300	3,47553900
H	-1,46140900	-2,36650600	3,47863100
H	0,29283700	-2,32790400	3,16779400
H	-0,39744700	-1,37726500	4,49759800
C	1,60023600	0,13668300	-0,05121500
C	2,77545100	0,93511000	0,07502100
C	1,78694700	-1,22550000	-0,38514800
C	4,04735600	0,42218800	-0,14521200
C	3,04940600	-1,75277400	-0,57974800
H	0,92558600	-1,86916300	-0,49371200
C	4,17515800	-0,92440200	-0,46188800
H	4,91580500	1,05983500	-0,04727800
H	3,16640100	-2,80084400	-0,82606200
N	2,70303000	2,34187700	0,44915900
O	3,56556400	3,10519000	-0,00700900
O	1,81230300	2,71379000	1,21840200
N	5,49768000	-1,47267300	-0,67092500
O	5,60153400	-2,67334600	-0,96197400
O	6,47873400	-0,72328400	-0,55547600
C	-3,78400800	-1,58733300	0,98313900
C	-4,30210500	-0,56106700	-0,87322900
H	-3,25730700	-1,97385600	1,84114100
N	-3,27633100	-0,81500400	0,03289200
C	-4,11845400	0,25634300	-2,11293900
H	-5,09213400	0,41815500	-2,57993300
H	-3,69199900	1,23611300	-1,86603400
N	-5,08771000	-1,83952700	0,73526500
C	-5,43408400	-1,20302200	-0,43647400
H	-6,42908100	-1,25878500	-0,85031600
H	-5,69607000	-2,40438000	1,31644100
O	-3,29167400	-0,39778300	-3,09491000
H	-2,41918500	-0,52805300	-2,66697500

B.22. Coordenadas cartesianas (xyz) do ET da reação do 5MOMI com DEDNPP

P	-0,59356400	0,18867800	0,00540800
O	-0,65551100	-0,62099500	-1,25341600
O	-1,14613600	1,68227500	0,14920500
O	-0,46474000	-0,57076500	1,40887200
O	1,08026000	0,76749800	-0,02671100
C	-0,66440400	2,81630700	-0,65977100
H	0,25793300	3,17943600	-0,20496500
H	-0,45473100	2,46207100	-1,67167400
C	-0,16637500	0,13381900	2,66424500
H	-1,02749000	0,76190700	2,90682900
H	0,71156900	0,76510500	2,50764700
C	-1,75356400	3,86604700	-0,65005200
H	-1,40740800	4,73949400	-1,21308400

H	-2,66952300	3,49295200	-1,11813500
H	-1,98116200	4,18652100	0,37151400
C	0,08025400	-0,91371600	3,72654000
H	0,29206900	-0,41081900	4,67609900
H	-0,79886900	-1,55079600	3,86443300
H	0,93879100	-1,54198900	3,47054600
C	2,18644600	0,04936100	-0,16280800
C	3,43680000	0,72865000	-0,23979600
C	2,21573400	-1,35990000	-0,27130500
C	4,63578600	0,05773600	-0,43901200
C	3,40635000	-2,04197600	-0,44098300
H	1,29021400	-1,91625000	-0,22542900
C	4,61068300	-1,32893600	-0,52698800
H	5,56585500	0,60720300	-0,50089700
H	3,40648900	-3,12269400	-0,51019300
N	3,51812800	2,17773400	-0,10272200
O	4,37784700	2,77316700	-0,76564000
O	2,75364800	2,74710800	0,68095600
N	5,85709000	-2,04165400	-0,70549400
O	5,82359300	-3,27666300	-0,80750900
O	6,91297100	-1,39358200	-0,75040200
C	-5,00913900	-0,35634000	-0,10577500
C	-3,79298600	0,06016600	-0,58881700
C	-3,39485400	-0,87466200	1,32710700
N	-4,72801800	-0,94740800	1,11517400
H	-5,40305900	-1,36405400	1,74633900
H	-3,58096300	0,57237300	-1,51616600
H	-2,91024900	-1,26716200	2,20775500
N	-2,80020100	-0,26602900	0,31056300
C	-6,37722800	-0,25261600	-0,67782200
H	-7,08587700	0,13545300	0,06787200
H	-6,35459700	0,44507900	-1,52485600
O	-6,81937400	-1,54665500	-1,11871900
C	-8,13130700	-1,49504000	-1,68390300
H	-8,15177000	-0,85049200	-2,57303800
H	-8,39582400	-2,51511600	-1,97010400
H	-8,86056300	-1,12139600	-0,95251000

B.23. Coordenadas cartesianas (xyz) do ET da reação do 4MOMI com DEDNPP

P	-0,90010500	-0,28442600	0,17174300
O	-0,81512000	-0,18942900	-1,32197200
O	-1,63679400	0,77121100	1,12388000
O	-0,65143700	-1,69306500	0,89376700
O	0,69766700	0,39320500	0,61679400
C	-1,31801800	2,20907200	1,16256100
H	-0,42984200	2,33740200	1,78187600
H	-1,10222000	2,54625600	0,14598000
C	-0,35704700	-1,81442800	2,32920200
H	-1,23682800	-1,47178200	2,87998700
H	0,49220400	-1,16973800	2,56534800
C	-2,51889700	2,92044500	1,74632900
H	-2,29656700	3,99106700	1,81130300
H	-3,40525900	2,78901600	1,11872200
H	-2,73906400	2,55532200	2,75451500
C	-0,05210500	-3,26918600	2,60813800
H	-0,90252900	-3,90910900	2,35258900
H	0,82623700	-3,60258300	2,04703500
H	0,15667800	-3,38742600	3,67673900
C	1,87291100	0,06996000	0,10249300

C	3,00265800	0,89577900	0,38062800
C	2,09146300	-1,04316600	-0,74422700
C	4,25443200	0,65401200	-0,17050700
C	3,33750300	-1,30804500	-1,27859900
H	1,26626500	-1,69979300	-0,98074700
C	4,41394600	-0,45482100	-0,99242100
H	5,08563900	1,30872700	0,05594800
H	3,48099200	-2,17115500	-1,91658700
N	2,89545700	2,05140500	1,26022800
O	3,60304400	3,03650900	1,00786000
O	2,12967200	1,99989600	2,22691400
N	5,71646000	-0,72840700	-1,55749000
O	5,83732600	-1,69619200	-2,32337400
O	6,66526300	0,01249100	-1,25931900
C	-3,42863200	-2,19051400	0,50709900
C	-4,01360500	-0,51988400	-0,76787300
H	-2,86920400	-2,87026500	1,12953800
N	-2,96495800	-1,07860200	-0,05107100
C	-3,87567800	0,74609400	-1,55593400
H	-3,36816400	1,51720100	-0,96058800
H	-3,27301600	0,57567000	-2,45982600
N	-4,72509700	-2,36928300	0,18244800
C	-5,11796500	-1,32200000	-0,62640800
H	-6,11903300	-1,24537500	-1,01830100
H	-5,30441700	-3,14415400	0,48278200
O	-5,17878400	1,19278900	-1,92614400
C	-5,12924000	2,35887300	-2,75023700
H	-4,64059000	3,19059500	-2,22530800
H	-4,58852300	2,15671700	-3,68451700
H	-6,16126800	2,63153400	-2,98014900

B.24. Coordenadas cartesianas (xyz) do ET da reação do 5FZ com DEDNPP

P	-1,15442900	0,03542700	-0,23568100
O	-0,86237600	-0,44231400	-1,62783100
O	-1,81957900	1,44524800	0,14254500
O	-1,24180500	-0,94822700	1,02230100
O	0,45772800	0,71373400	0,17436000
C	-2,03405400	2,46637900	-0,88958400
H	-1,07191000	2,68979600	-1,35891900
H	-2,71694800	2,05506300	-1,63907800
C	-0,83699400	-0,59438900	2,39274900
H	-1,32854800	0,34328500	2,66292500
H	0,24525400	-0,45494600	2,40958800
C	-2,61820300	3,68465200	-0,20965100
H	-2,78991200	4,46294500	-0,96098300
H	-3,57549500	3,44890300	0,26573500
H	-1,93254900	4,08138100	0,54560900
C	-1,26415900	-1,73361100	3,29181100
H	-0,96655900	-1,50026800	4,31985300
H	-2,34927200	-1,87327800	3,27013900
H	-0,77828900	-2,66935600	2,99783000
C	1,63411100	0,12923200	0,01866500
C	2,82275600	0,91682900	0,08539700
C	1,79883600	-1,25613700	-0,22481800
C	4,08614400	0,36732900	-0,09990300
C	3,05114600	-1,81696900	-0,38205500
H	0,92491100	-1,89097900	-0,28076000
C	4,19106700	-0,99978400	-0,32260900
H	4,96511600	0,99611900	-0,04896100

H	3,15150800	-2,88182100	-0,55261800
N	2,77233600	2,34808400	0,34803600
O	3,66328400	3,05765800	-0,14113100
O	1,86777600	2,79906200	1,05763800
N	5,50332600	-1,58562800	-0,48958900
O	5,58644100	-2,81314100	-0,64601900
O	6,49696700	-0,84346500	-0,47284700
C	-5,36233200	-1,03679300	-0,22767900
C	-4,22548300	-0,63812900	0,40580600
C	-3,74713800	-1,00872100	-1,69971200
N	-5,07135200	-1,27056700	-1,54480400
H	-4,06712000	-0,36947300	1,43821500
H	-3,22720400	-1,10758000	-2,63936600
N	-3,21899000	-0,63347200	-0,54640300
H	-5,71597100	-1,58981200	-2,26116900
F	-6,61216500	-1,21200800	0,23265000

B.25. Coordenadas cartesianas (xyz) do ET da reação do 5CIZ com DEDNPP

P	-0,87486900	0,07600500	-0,21930500
O	-0,56398000	-0,41836100	-1,60207900
O	-1,49646600	1,51655800	0,12217400
O	-1,04678500	-0,88244800	1,05015300
O	0,74644100	0,69389000	0,23502700
C	-1,65677400	2,52122300	-0,93471200
H	-0,68561500	2,68029600	-1,41177700
H	-2,36322500	2,12872800	-1,67240400
C	-0,51121800	-0,60485300	2,39405700
H	-0,72366400	0,43684700	2,64382800
H	0,56856000	-0,76267400	2,37119000
C	-2,17272600	3,78719700	-0,28630300
H	-2,30915200	4,55193600	-1,05848900
H	-3,13760400	3,61502700	0,20107000
H	-1,46271700	4,16910900	0,45387400
C	-1,19085200	-1,55967100	3,35091300
H	-0,79462300	-1,38853400	4,35773800
H	-2,27281700	-1,39751500	3,37347800
H	-0,99142700	-2,60062700	3,07724600
C	1,91174700	0,09268400	0,05811700
C	3,11357300	0,85950000	0,12486700
C	2,05009400	-1,29125300	-0,20665000
C	4,36582300	0,29153300	-0,08025500
C	3,29120000	-1,87096500	-0,38397700
H	1,16390500	-1,90909200	-0,26309300
C	4,44501600	-1,07365600	-0,32445000
H	5,25604800	0,90425400	-0,02893700
H	3,37176500	-2,93474300	-0,57077000
N	3,08903900	2,28833600	0,40581500
O	3,98504700	2,98965400	-0,08584800
O	2,20040500	2,74455600	1,13186100
N	5,74554600	-1,67761000	-0,51797700
O	5,80733400	-2,90400700	-0,69125100
O	6,75020900	-0,95055700	-0,50755600
C	-5,13077900	-0,81157800	-0,35417800
C	-3,98331200	-0,53891600	0,33110100
C	-3,46497200	-0,76413900	-1,77918700
N	-4,80214700	-0,95240600	-1,68062600
H	-3,83814600	-0,36547400	1,38602200
H	-2,92305300	-0,81537800	-2,71034300
N	-2,94835200	-0,51972800	-0,58396400

H	-5,43387000	-1,16273800	-2,44702400
Cl	-6,78520500	-0,98803300	0,20878400

B.26. Coordenadas cartesianas (xyz) do ET da reação do 5BrZ com DEDNPP

P	-0,33276800	0,12124700	-0,17965100
O	-0,00117300	-0,40374000	-1,54639600
O	-0,89708400	1,59408000	0,12247900
O	-0,60961700	-0,80283500	1,09628600
O	1,30113500	0,65943200	0,32290600
C	-0,77374300	2,65312700	-0,88531500
H	0,27929500	2,74252000	-1,16644700
H	-1,36007100	2,35749900	-1,76081200
C	-0,03428700	-0,58836000	2,43612500
H	-0,05292100	0,48036400	2,65809900
H	0,99860400	-0,94081200	2,41958700
C	-1,29513100	3,93311100	-0,27011200
H	-1,21715600	4,73876000	-1,00805500
H	-2,34620300	3,83276000	0,01834700
H	-0,70957000	4,21521100	0,61049700
C	-0,87454500	-1,37769600	3,41563800
H	-0,45082400	-1,25523100	4,41849200
H	-1,90829100	-1,01907600	3,43219400
H	-0,87072200	-2,44444100	3,17010600
C	2,45232500	0,04054000	0,11815700
C	3,66679600	0,78944100	0,13085600
C	2,55989100	-1,35074000	-0,11970400
C	4,90342300	0,19495200	-0,09585800
C	3,78523900	-1,95549700	-0,32070100
H	1,66165400	-1,95375700	-0,13383700
C	4,95275200	-1,17611600	-0,31177300
H	5,80450600	0,79358300	-0,08484900
H	3,84341000	-3,02430800	-0,48568700
N	3,67291000	2,22537700	0,37200700
O	4,57673400	2,89541600	-0,14868700
O	2,80005100	2,71987000	1,09215900
N	6,23751600	-1,80613100	-0,52911000
O	6,27249800	-3,03488400	-0,69183200
O	7,25517900	-1,09790500	-0,54823100
C	-4,63308500	-0,55269200	-0,47488600
C	-3,49710300	-0,34350400	0,25489300
C	-2,90311200	-0,58766700	-1,83085000
N	-4,25080200	-0,70619200	-1,78872600
H	-3,38150200	-0,17998000	1,31518600
H	-2,32777200	-0,66490600	-2,73999000
N	-2,42424900	-0,37388500	-0,61434000
H	-4,84884600	-0,88793400	-2,58758300
Br	-6,46308600	-0,63691500	0,07635500

B.27. Coordenadas cartesianas (xyz) do ET da reação do 5IZ com DEDNPP ^a

P	0,20210000	0,19792500	-0,14904300
O	0,53355600	-0,29928900	-1,52490100
O	-0,35738900	1,66079900	0,19578100
O	-0,10295200	-0,77148600	1,08427900
O	1,83199900	0,69872300	0,38261100
C	-0,26227700	2,74140900	-0,79251300
H	0,78784100	2,85924600	-1,07464600
H	-0,84502500	2,44906000	-1,67135100
C	0,35486200	-0,52956100	2,46388900

H	0,18408700	0,52160700	2,70612500
H	1,42378300	-0,74565100	2,50927300
C	-0,80985600	3,99723500	-0,15115400
H	-0,75173100	4,81799900	-0,87408700
H	-1,85748400	3,86789600	0,13800100
H	-0,22776700	4,27566800	0,73292300
C	-0,43812300	-1,44798100	3,36704000
H	-0,09955600	-1,30197400	4,39859600
H	-1,50869400	-1,22652600	3,32004100
H	-0,27876300	-2,49762500	3,10038500
C	2,96513700	0,04398300	0,17066500
C	4,19575100	0,76180300	0,12287900
C	3,03053500	-1,35628500	-0,02085100
C	5,40920000	0,13161200	-0,12953900
C	4,23351400	-1,99726300	-0,24688300
H	2,11812900	-1,93698400	0,02091600
C	5,41760500	-1,24608100	-0,30618100
H	6,32399200	0,70803000	-0,16943300
H	4,26143600	-3,07194200	-0,37782900
N	4,24234200	2,20285400	0,32572300
O	5,12984500	2,84106300	-0,25818800
O	3,41879000	2,73008400	1,07990300
N	6,67927600	-1,91234500	-0,55253600
O	6,67749400	-3,14213500	-0,70862200
O	7,71399900	-1,23134000	-0,60109900
C	-4,15166300	-0,42079500	-0,53747100
C	-3,01719800	-0,22280100	0,20534700
C	-2,38666200	-0,46541700	-1,86514200
N	-3,73533900	-0,57380600	-1,84423800
H	-2,92015100	-0,06175900	1,26799200
H	-1,79663600	-0,54568200	-2,76486800
N	-1,92558100	-0,25830400	-0,64039100
H	-4,32991100	-0,74601700	-2,64719600
I	-6,15750200	-0,49761400	0,03249600

^a Para o iodo foi utilizado conjunto de base LANL2DZ

B.28. Coordenadas cartesianas (xyz) do ET da reação do 5IPZ com DEDNPP

P	-0,57005700	0,16435600	-0,28187700
O	-0,28823800	-0,36005500	-1,65571200
O	-1,16152000	1,61400600	0,05007700
O	-0,81783000	-0,80435000	0,96122100
O	1,05220700	0,71440800	0,19536500
C	-1,13638400	2,67359000	-0,96686500
H	-0,10800300	2,78945900	-1,31985600
H	-1,77192100	2,35653400	-1,79879300
C	-0,46066600	-0,46785700	2,35218600
H	-0,85699300	0,52525900	2,57514700
H	0,62784800	-0,45287900	2,43004400
C	-1,65076100	3,94065300	-0,32171000
H	-1,64443800	4,74359300	-1,06637200
H	-2,67667700	3,81279100	0,03706100
H	-1,01557300	4,24354400	0,51633600
C	-1,06937400	-1,52888700	3,24070900
H	-0,80752700	-1,30706900	4,28085500
H	-2,15998400	-1,54141700	3,15526000
H	-0,67998500	-2,52117200	2,99280400
C	2,19878000	0,06371300	0,05338900
C	3,42508700	0,78517300	0,14337500
C	2,28759100	-1,32539500	-0,19477200

C	4,65880300	0,16947800	-0,03093700
C	3,50970800	-1,95304500	-0,34149900
H	1,38007700	-1,90931000	-0,26580400
C	4,69042700	-1,19948500	-0,26351600
H	5,57001000	0,74865800	0,03607800
H	3,55393000	-3,02035800	-0,51884400
N	3,44734800	2,21541500	0,41978600
O	4,37381800	2,88253300	-0,06136900
O	2,56650500	2,70309500	1,13415600
N	5,97132800	-1,85401000	-0,42608900
O	5,99027000	-3,08411100	-0,57774900
O	7,00090100	-1,16369400	-0,41112700
C	-5,00690900	-0,50673300	-0,49824900
C	-3,82512600	-0,31327100	0,17845600
C	-3,28313000	-0,53566400	-1,91080200
N	-4,63075100	-0,64563800	-1,82527800
H	-3,66936000	-0,15772400	1,23531900
H	-2,73639000	-0,60744600	-2,83845900
N	-2,76438600	-0,33861200	-0,71011700
H	-5,25446500	-0,81363600	-2,60614500
C	-6,44044700	-0,56920200	-0,04631900
C	-7,09323600	-1,91819000	-0,40824300
C	-6,55887400	-0,28326700	1,45639600
H	-6,59294100	-2,74379400	0,11105600
H	-8,14755900	-1,91564200	-0,11139800
H	-7,04973000	-2,11532500	-1,48477800
H	-6,13270600	0,69126800	1,71618100
H	-7,61205100	-0,28303600	1,75400100
H	-6,04293300	-1,04992900	2,04598400
H	-6,98840400	0,21787800	-0,58413100

B.29. Coordenadas cartesianas (xyz) do ET da reação do 5AZ com DEDNPP

P	-1,10024500	0,03484400	-0,20724900
O	-0,82689600	-0,44664900	-1,59854900
O	-1,78541400	1,42952100	0,17311400
O	-1,22893400	-0,97007500	1,02557100
O	0,49350300	0,69850000	0,22067100
C	-2,01402700	2,45613400	-0,85145600
H	-1,05584700	2,69217200	-1,32233100
H	-2,69549900	2,04172300	-1,59980400
C	-0,86706000	-0,62756200	2,41272000
H	-1,37004400	0,30571900	2,67621500
H	0,21386500	-0,48449300	2,46059900
C	-2,60779800	3,66296100	-0,16072700
H	-2,79151000	4,44385200	-0,90627000
H	-3,56014700	3,41347000	0,31717300
H	-1,92319100	4,06245000	0,59381500
C	-1,31609800	-1,77513400	3,28852800
H	-1,04775800	-1,54927800	4,32618300
H	-2,39971200	-1,91659100	3,23560600
H	-0,81984600	-2,70713900	3,00067500
C	1,67324200	0,11685200	0,04980400
C	2,85551300	0,91217400	0,08952400
C	1,83883800	-1,26818200	-0,18269400
C	4,11854900	0,36789000	-0,11136900
C	3,09150300	-1,82393300	-0,35695800
H	0,96730100	-1,90780300	-0,21646900
C	4,22647500	-1,00009600	-0,32429900
H	4,99463200	1,00174700	-0,08163600

H	3,19479200	-2,88946900	-0,51999000
N	2,80017400	2,34607000	0,33817000
O	3,68055700	3,05479900	-0,16986800
O	1,90173600	2,79853100	1,05383900
N	5,53977200	-1,58045900	-0,51074600
O	5,62506900	-2,80664900	-0,67168000
O	6,52950200	-0,83391400	-0,50536800
C	-5,46318900	-1,00285700	-0,28647800
C	-4,29783100	-0,64769900	0,35417800
C	-3,78200900	-0,95085400	-1,73912700
N	-5,11742100	-1,19415200	-1,60857400
H	-4,14391300	-0,41823600	1,39783600
H	-3,25749300	-1,01703900	-2,67929800
N	-3,26235100	-0,63216300	-0,57027700
H	-5,74482900	-1,46862900	-2,35542100
N	-6,75234900	-1,25943300	0,17720500
H	-6,88560000	-0,90984900	1,12091700
H	-7,47592500	-0,88496500	-0,43123300

B.30. Coordenadas cartesianas (xyz) do ET da reação do 5HZ com DEDNPP

P	-1,12093300	-0,03176600	-0,17049000
O	-0,80478300	-0,49953700	-1,55836300
O	-1,81128400	1,36567700	0,19960000
O	-1,29025100	-1,03838300	1,05698100
O	0,46321400	0,62545500	0,30668500
C	-1,79746200	2,47439200	-0,76289400
H	-0,76209200	2,66199000	-1,06042600
H	-2,37830000	2,16724800	-1,63772100
C	-0,87905500	-0,73265500	2,43935300
H	-1,26510600	0,25487500	2,70136400
H	0,21147300	-0,71986400	2,47680500
C	-2,40677500	3,67823900	-0,08047400
H	-2,41821600	4,51631500	-0,78532600
H	-3,43638600	3,47510600	0,22995900
H	-1,82166300	3,97316200	0,79607300
C	-1,45444200	-1,81424900	3,32565200
H	-1,14926600	-1,61966600	4,35938200
H	-2,54777100	-1,82240200	3,28460700
H	-1,07902700	-2,80094700	3,03689100
C	1,65236900	0,07655100	0,10302900
C	2,81447700	0,90180000	0,10536600
C	1,84537900	-1,30582600	-0,12439800
C	4,08505800	0,38643400	-0,12364100
C	3,10590500	-1,83202300	-0,33063100
H	0,98736600	-1,96501300	-0,12836600
C	4,22040700	-0,97952100	-0,33256200
H	4,94594400	1,04143500	-0,12150300
H	3,23255700	-2,89584000	-0,48893800
N	2,72909000	2,33663100	0,33760100
O	3,58828900	3,05896900	-0,18786400
O	1,82639300	2,77844700	1,05465700
N	5,54220900	-1,52786900	-0,55301800
O	5,64945400	-2,74672800	-0,75160900
O	6,51694000	-0,76207800	-0,53875700
C	-5,46009400	-0,92701200	-0,38741700
C	-4,30231100	-0,71240300	0,31524800
C	-3,76225200	-0,85107300	-1,79461600
N	-5,11288900	-1,01471300	-1,71305200
H	-4,16268700	-0,58914700	1,37801700

H	-3,21807000	-0,87043900	-2,72545600
N	-3,25212600	-0,67297000	-0,59096900
H	-5,74736200	-1,17635100	-2,48705700
O	-6,76661000	-1,05988700	-0,03983800
H	-6,85952900	-0,95292200	0,92107300

B.31. Coordenadas cartesianas (xyz) do ET da reação do 2AZ com DEDNPP

P	-1,21205400	0,01207200	-0,02528500
O	-0,93786300	-0,56590600	-1,38209100
O	-1,90544900	1,42370700	0,26329900
O	-1,30081000	-0,90800100	1,27647900
O	0,37366200	0,73283500	0,33153400
C	-2,44169500	2,26147500	-0,81463200
H	-1,63245900	2,47748000	-1,51716600
H	-3,22780400	1,69816000	-1,32349200
C	-0,88880600	-0,46718200	2,62238000
H	-1,28922900	0,53413600	2,79517900
H	0,20205800	-0,43371000	2,64633700
C	-2,97998900	3,52441900	-0,18016100
H	-3,38435100	4,17058100	-0,96652600
H	-3,78483000	3,29791200	0,52593400
H	-2,18938700	4,07168600	0,34219700
C	-1,43831400	-1,46780700	3,61353000
H	-1,12643500	-1,16982500	4,62042200
H	-2,53158000	-1,49637600	3,58526000
H	-1,04884700	-2,47172200	3,41802500
C	1,55897300	0,16325000	0,14826000
C	2,71677000	0,98228800	0,00539000
C	1,74952600	-1,23596100	0,07643600
C	3,97953300	0,44314000	-0,21259300
C	3,00247700	-1,78339200	-0,12041200
H	0,89663600	-1,89217000	0,18766900
C	4,11275000	-0,93780200	-0,26441500
H	4,83577500	1,09461600	-0,32536600
H	3,12700500	-2,85851200	-0,15652800
N	2,63501100	2,43457200	0,06378900
O	3,46572600	3,08643400	-0,58474200
O	1,76393800	2,96064200	0,76293600
N	5,42721500	-1,51007500	-0,46892600
O	5,52404600	-2,74168400	-0,56922000
O	6,40555900	-0,75194000	-0,53668500
C	-5,51548900	-1,17074800	0,22676200
C	-4,32611600	-0,72882500	0,72207000
C	-3,98777500	-1,14253000	-1,39259100
N	-5,28774700	-1,43178900	-1,12284300
H	-4,08170300	-0,42432700	1,72875100
N	-3,37070000	-0,71932000	-0,29012900
H	-5,96360500	-1,77736900	-1,79265700
H	-6,47970300	-1,33151400	0,68262100
N	-3,43991500	-1,21113300	-2,65096600
H	-2,42379700	-1,19818400	-2,61691100
H	-3,82549900	-1,93838000	-3,24315800

B.32. Coordenadas cartesianas (xyz) do ET₁ da reação do 2HZ com DEDNPP

P	-1,24366600	0,00035100	0,02903200
O	-0,98165100	-0,69801100	-1,28421800
O	-1,95055900	1,42576600	0,16506700
O	-1,34120300	-0,78115800	1,41475600

O	0,33350400	0,73178100	0,29047600
C	-2,35175100	2,19076000	-1,02400100
H	-1,46989900	2,33020700	-1,65474200
H	-3,09903200	1,60420700	-1,56573400
C	-0,78445400	-0,27975500	2,68895900
H	-0,97664000	0,79291900	2,75338100
H	0,29186700	-0,46061200	2,67693600
C	-2,91395200	3,51097600	-0,54735400
H	-3,22882500	4,09471100	-1,41873400
H	-3,78452400	3,35799500	0,09772600
H	-2,16066700	4,08643500	-0,00079100
C	-1,46760600	-1,03998500	3,80235600
H	-1,05610400	-0,70318300	4,75992900
H	-2,54584500	-0,85452400	3,80493500
H	-1,28987100	-2,11611500	3,71254800
C	1,52254400	0,15503200	0,12934500
C	2,67529800	0,97461200	-0,03206100
C	1,71598900	-1,24324800	0,10047200
C	3,94161800	0,43593200	-0,22661200
C	2,97279600	-1,79114700	-0,07567500
H	0,86531200	-1,89956300	0,22584200
C	4,07950900	-0,94569500	-0,23823700
H	4,79621900	1,08728000	-0,35316900
H	3,10159000	-2,86632600	-0,08092100
N	2,58380500	2,42863900	-0,01833400
O	3,39253300	3,06341100	-0,70896400
O	1,72686500	2,96930700	0,68645600
N	5,39813900	-1,51870200	-0,42017200
O	5,49843400	-2,75112100	-0,49908400
O	6,37429700	-0,75870200	-0,49049400
C	-5,59134700	-1,07100200	0,04494200
C	-4,46538200	-0,60432200	0,65632100
C	-3,85096200	-1,33404000	-1,29209700
N	-5,18298200	-1,53759800	-1,20386300
H	-4,35587000	-0,16325100	1,63583700
N	-3,37237600	-0,77796600	-0,18915200
H	-5,76423100	-1,95399800	-1,92106000
H	-6,62068200	-1,12392600	0,36203900
O	-3,14220500	-1,66949600	-2,37458300
H	-2,20782400	-1,38105200	-2,16230300

B.33. Coordenadas cartesianas (xyz) do intermediário pentacoordenado da reação do 2HZ com DEDNPP

P	-1,45896500	-0,05097800	-0,02621800
O	-0,98637200	-0,72192900	-1,31148900
O	-1,99675800	1,46274500	0,05464700
O	-1,39750300	-0,68185800	1,44493900
O	0,29544300	0,76351600	0,21724300
C	-2,47944700	2,14811000	-1,14980900
H	-1,63345100	2,26719900	-1,83199600
H	-3,24168800	1,52241100	-1,62415500
C	-0,75814300	-0,09428000	2,63217200
H	-0,97400900	0,97540800	2,64750100
H	0,31840600	-0,24906500	2,55545900
C	-3,04661200	3,48308400	-0,72000300
H	-3,40263200	4,01878500	-1,60618000
H	-3,88961000	3,35040700	-0,03499400
H	-2,28282000	4,09579900	-0,23148900
C	-1,33158400	-0,80135900	3,84056600

H	-0,85369500	-0,39885900	4,74022700
H	-2,41094200	-0,64176800	3,92204500
H	-1,13225700	-1,87684200	3,79978400
C	1,46322700	0,20219300	0,09704000
C	2,65169900	0,99950200	-0,05466800
C	1,65891800	-1,21174300	0,09607900
C	3,91108000	0,43136200	-0,21788200
C	2,90401700	-1,77797500	-0,04893300
H	0,79753000	-1,85317800	0,22166000
C	4,03343300	-0,95103700	-0,20878600
H	4,77915200	1,06560100	-0,33640300
H	3,01835800	-2,85484600	-0,03212500
N	2,59883100	2,44759400	-0,06224700
O	3,51444100	3,06381400	-0,63424000
O	1,66502600	3,02673100	0,50646700
N	5,33770400	-1,54090200	-0,35735400
O	5,42605800	-2,77927100	-0,41447700
O	6,33252800	-0,79902900	-0,42427900
C	-5,38060700	-1,13450400	0,18368700
C	-4,28184600	-0,52697000	0,69373800
C	-3,68474300	-1,47415000	-1,20846000
N	-4,98783400	-1,72828400	-1,01651800
H	-4,15874200	0,03801600	1,60341300
N	-3,20982600	-0,74895100	-0,18085900
H	-5,56869800	-2,26417900	-1,65157500
H	-6,39312000	-1,20648200	0,54621300
O	-2,99727800	-1,89269400	-2,25081100
H	-2,06045700	-1,51952700	-2,08771600

B.34. Coordenadas cartesianas (xyz) do ET₂ da reação do 2HZ com DEDNPP

P	-1,49413700	-0,05929800	-0,03185400
O	-1,00696100	-0,72079600	-1,31380100
O	-2,00375900	1,45982400	0,06202200
O	-1,40806200	-0,68441400	1,43688800
O	0,31030300	0,76902500	0,20805700
C	-2,46067900	2,17517800	-1,13620300
H	-1,61669600	2,25294600	-1,82659400
H	-3,25958500	1,59148800	-1,60386000
C	-0,77748100	-0,08355800	2,62297300
H	-0,99988500	0,98473800	2,62871900
H	0,29981000	-0,23299400	2,54926500
C	-2,95091700	3,53505900	-0,69309300
H	-3,29738700	4,08990300	-1,57125800
H	-3,78582000	3,44207800	0,00828200
H	-2,14753900	4,10667300	-0,21860900
C	-1,35130500	-0,78506600	3,83418300
H	-0,87874200	-0,37292400	4,73231000
H	-2,43176700	-0,63072500	3,91080500
H	-1,14571800	-1,85962400	3,80224000
C	1,47239900	0,20715400	0,09292800
C	2,67017500	0,99537100	-0,06116700
C	1,66190500	-1,21052200	0,09819700
C	3,92553700	0,41673400	-0,21871600
C	2,90239700	-1,78528900	-0,04141500
H	0,79545000	-1,84494700	0,22534500
C	4,03929000	-0,96644100	-0,20229200
H	4,79862200	1,04388300	-0,33776000
H	3,00978600	-2,86280600	-0,01946100
N	2,62840200	2,44219400	-0,07647400

O	3,55524500	3,05068300	-0,64029100
O	1,69155200	3,03204500	0,47739500
N	5,33859200	-1,56456200	-0,34258900
O	5,42037300	-2,80451900	-0,39144900
O	6,33954900	-0,82982300	-0,41093200
C	-5,40326100	-1,12700700	0,18159000
C	-4,30494600	-0,51810200	0,68978000
C	-3,70869200	-1,47424800	-1,21087200
N	-5,01114600	-1,72570600	-1,01646100
H	-4,18063200	0,05046300	1,59703300
N	-3,23329300	-0,74458000	-0,18521700
H	-5,59295700	-2,26357600	-1,64918400
H	-6,41588100	-1,19671600	0,54418400
O	-3,02293800	-1,89794600	-2,25146300
H	-2,08583200	-1,52802600	-2,09522200